



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Química

---

**Biotecnología y vacunas.**  
**Proteómica aplicada a la identificación de**  
**factores de virulencia e inmunógenos presentes**  
**en el fenotipo infectante de *Bordetella pertussis***

**Bioq. Jimena Alvarez Hayes**

**Tesis Doctoral**

**Dra. María Eugenia Rodríguez**  
**Directora**

**2013**



EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI), FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA; BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA EUGENIA RODRÍGUEZ.



PARTE DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS HAN DADO ORIGEN A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

Alvarez Hayes, J., Erben, E., Lamberti, Y., Ayala, M., Maschi, F., Carbone, C., Gatti, B., Parisi, G., Rodríguez, ME. "Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*". *Vaccine*. 2011. Nov 3;29(47):8731-9.

Alvarez Hayes, J., Erben, E., Lamberti, Y., Principi, G., Maschi, F., Ayala, M., Carbone, C., Rodríguez, ME. "*Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components". *Vaccine*. En revisión.



MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLOGÍA (ANPCYT), A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.





## AGRADECIMIENTOS

Me resulta sumamente placentero llegar a escribir los agradecimientos y darme cuenta que tengo tanta gente al lado mío que me ha apoyado, a su manera, en cada etapa del doctorado.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez, mi directora de Tesis. Gracias Euge por guiarme en cada paso de mi trabajo, por estar siempre abierta a la discusión constructiva y por transmitirme tus conocimientos. No puedo dejar de agradecerte también por tu apoyo y contención, no sólo en el trabajo cuando las cosas no salían como esperábamos, sino también en lo personal, por haber estado siempre que lo necesite. Infinitas gracias.

A Esteban, por ayudarme en un momento crítico de mi trabajo con el clonado y expresión de las proteínas. Gracias por tu colaboración, por estar dispuesto a levantarte temprano y a quedarte hasta tarde en el laboratorio para ayudarme. E incluso por ir algún que otro fin de semana a continuar con el trabajo. Gracias por tus charlas y compañerismo. Fue muy divertido trabajar con vos.

A Fabricio Machi, Miguel Ayala y la Dra. Cecilia Carbone por su colaboración en los trabajos con animales de laboratorio. Gracias por estar dispuestos al trabajo, a venir al laboratorio y estar sentados horas frente al banco de flujo.

Al Dr. Gustavo Parisi por colaborar con nosotros en los estudios de bioinformática realizados en este trabajo.

A la Dra. Alejandra Bosch y el Dr. Osvaldo Yantorno. Gracias por su ayuda con los estudios de FT-IR y por dedicar parte de su tiempo a transmitirme sus conocimientos.

A la Dra. Silvana Petruccelli, por guiarme en mis primeros trabajos de biología molecular.

A mis compañeros de laboratorio, que son amigos además de compañeros,

Yani y Lau, gracias amigas por estar siempre, tanto para ayudarme en el laboratorio como para escucharme y aconsejarme cuando lo necesito. Por estar en los momentos felices y en los que no lo son tanto.

Juano, gracias amigo por ayudarme con los ensayos de células. Por escucharme, aunque no siempre nos pongamos de acuerdo. A Huguis, gracias por tu buena onda, por estar siempre dispuesto a transmitir tus conocimientos y por tantas charlas amenas.

A Natu, por tanta predisposición al trabajo en el laboratorio. Por recibirme con un mate preparado en el box casi todas las mañanas. Gracias por tu amistad y compañerismo. A Pablo por su buena onda y por colaborar conmigo en la preparación de los mates necesarios cuando estamos sentados frente a la computadora.

A Julio, por su infinita colaboración en el preparado de material y en los ensayos de ELISA. Sin tu ayuda todo hubiera sido más difícil. Gracias también por esos mates riquísimos que nos preparas.

A Clau, quien además de una muy buena compañera de laboratorio es una excelente docente, gracias por guiarme en esa tarea.

Un muy especial agradecimiento a Yani y Natu por ayudarme en los últimos detalles de edición!!

A los que ya no están con nosotros en el laboratorio. Laurita, gracias por transmitirme tus conocimientos en mis primeros meses en el laboratorio. A Diego, para mí “Serra”, por su buena onda, por haber discutido conmigo posibles soluciones cuando no podía expresar las proteínas. A Alejandro, “la alegría del laboratorio”, por sus chistes y su buen humor en el trabajo.

Al Director del CINDEFI, Dr. Edgardo Donati, por permitirme realizar este trabajo de Tesis en el Instituto. A toda la gente del CINDEFI que, ya sea con reactivos o con equipos, han colaborado con mi trabajo. A todas las personas de otros Institutos que también me permitieron usar equipos o me prestaron reactivos, y con quienes incluso hemos discutido ensayos y resultados.

También quiero agradecer a mi familia y amigos que me apoyaron en cada paso.

A mi mamá Ángela, mi papá Justo y mi hermano Sebastián por saber aconsejarme, desde su lugar, en cada decisión tomada. Gracias por acompañarme en cada momento de esta etapa de forma incondicional, al igual que lo hicieron en cada momento de mi vida.

A mis amigos de la vida, que afortunadamente son demasiados para nombrarlos. Gracias por estar siempre, por apoyarme cuando las cosas en el laboratorio no salían, muchos de ustedes sin entender demasiado que significaba eso. Gracias por todo amigos.

Al resto de mi familia, tíos, abuelos que ya no están conmigo, primos. Gracias por interesarse siempre en mi trabajo.



## Lista de Abreviaturas

---

2-DE	Electroforesis bidimensional
ABGs	Agar Bordet-Gengou sangre
AF	Adyuvante de Freund
AFC	Adyuvante de Freund Completo
AFI	Adyuvante de Freund Incompleto
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
Bp	<i>Bordetella pertussis</i>
Bp-Fe	<i>Bordetella pertussis</i> limitada en hierro
BSA	Albúmina bovina
Bvg	Sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>
Bvg-	Fase avirulenta
Bvg+	Fase virulenta
BvgA	Activador transcripcional de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
Bvg <sup>i</sup>	Fase intermedia
BvgR	Represor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
BvgS	Sensor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CR3	Receptor del complemento 3
CyaA	Toxina adenilato ciclasa
DNT	Toxina dermonecrótica

DTPa	Vacuna acelular compuesta por antígenos purificados (Difteria, Tétano, Pertussis acelular)
DTPc	Vacuna formulada con toxoide diftérico y tetánico, y células <i>de B. pertussis</i> detoxificadas
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FcR	Receptor Fc
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
Fur	Regulador transcripcional de los genes involucrados en la captura de hierro
GFP	Proteína de fluorescencia verde
IgG	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleuquina 10
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
LF	Lactoferrina
LPS	Lipopolisacárido
LSD	Prueba de la menor diferencia significativa
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
Pa	Vacuna acelular
PBS	Buffer fosfato salino
Pc	Vacuna celular

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
Prn	Pertactina
PT	Toxina Pertussis
rAfuA	Proteína AfuA recombinante
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
Rib/c	Número inicial de bacterias por célula
rIRP1-3	Proteína IRP1-3 recombinante
rLip	Proteína Lip recombinante
SFB	Suero fetal bovino
SS	Stainer-Scholte medio líquido
SS-Fe	Stainer-Scholte medio líquido sin hierro
TF	Transferrina
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
UFC	Unidades formadores de colonia
vag	Genes activados en virulencia
vrg	Genes reprimidos en virulencia





## INDICE

<b>1. Introducción General.....</b>	<b>3</b>
1.1 Tos Convulsa.....	3
1.2 Epidemiología .....	4
1.3 Manifestaciones Clínicas.....	7
1.4 Factores de virulencia de <i>B. pertussis</i> .....	9
1.4.1 Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS .....	13
1.4.1.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA) .....	13
1.4.1.2 Fimbrias (Fim).....	14
1.4.1.3 Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores .....	15
1.4.1.4 Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA) .....	16
1.4.1.5 Toxina Dermonecrótica (DNT) .....	17
1.4.1.6 Toxina Pertussis (PT) .....	17
1.4.2 Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS .....	18
1.4.2.1 Citotoxina Traqueal (TCT).....	18
1.4.2.2 Lipopolisacárido (LPS) .....	19
1.4.2.3. Sistemas de Captura de Hierro de <i>B. pertussis</i> .....	19
1.5 Patogénesis.....	28
1.6 Tratamiento .....	30
1.7 Vacunación.....	31
1.7.1 Vacunas actuales .....	31
1.7.2 Estudio de nuevas Vacunas .....	33
1.8 Inmunidad .....	34
1.9 Antecedentes y objetivos de este trabajo.....	39
Referencias.....	43
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>65</b>
2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....	65
2.2 Detección de sideróforos.....	66
2.3 Células.....	66
2.4 Sueros.....	67
2.5 Proteómica comparativa de <i>B. pertussis</i> .....	67
2.6 Espectroscopía FT-IR de células enteras de <i>B. pertussis</i> .....	68
2.7 Análisis computacional de IRP1-3 (BP1152) .....	69

2.8	Clonado de genes de <i>B. pertussis</i> .....	69
2.9	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	71
2.10	Inmunización de ratones.....	72
2.11	Puesta a punto de la infección intranasal.....	72
2.12	Desafío de ratones inmunizados.....	73
2.13	Determinación de producción citoquinas por esplenocitos .....	73
2.14	Ensayos de ELISA .....	74
2.15	Ensayos de Opsonización.....	75
2.16	Cuantificación de la Fagocitosis .....	75
2.17	Ensayos de Western Blot.....	77
2.18	Ensayos de Dot Blot.....	77
2.19	Análisis de conservación de secuencias de genes en aislados clínicos .....	78
2.20	Análisis Estadístico .....	79
	Referencias.....	81
<b>3.</b>	<b>Análisis del fenotipo de <i>B. pertussis</i> cultivada en limitación de hierro.....</b>	<b>85</b>
3.1	Introducción .....	85
3.2	Resultados .....	89
3.2.1	Perfil proteico de <i>B. pertussis</i> cultivada en limitación de hierro.....	89
3.2.2	Proteínas cuya expresión se induce en limitación de hierro.....	113
3.2.3	Proteínas que presentan menor nivel de expresión cuando <i>B. pertussis</i> se cultiva bajo limitación de hierro .....	115
3.2.4	Análisis fenotípico de <i>B. pertussis</i> cultivada bajo limitación de hierro mediante espectroscopia FT-IR .....	116
3.2.5	Estudio de la interacción de <i>B. pertussis</i> limitada en hierro con células del sistema inmune del hospedador.....	122
3.3	Discusión.....	127
3.3	Conclusiones .....	137
	Referencias.....	139
<b>4.</b>	<b>Análisis de potenciales nuevos candidatos vacunales contra <i>B. pertussis</i> .....</b>	<b>147</b>
4.1	Introducción .....	147
4.2	Resultados .....	151
4.2.1	Estructura de AfuA, IRP1-3 y Lip.....	151

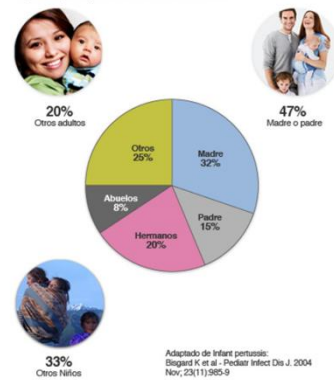
4.2.2	Clonado y purificación de las proteínas recombinantes rAfuA, rIRP1-3 y rLip .....	156
4.2.3	Capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes, rAfuA, rIRP1-3 y rLip	158
4.2.4	Evaluación del título de anticuerpos contra AfuA, IRP1-3 y Lip en sueros de individuos infectados con <i>B. pertussis</i> .....	159
4.2.5	Evaluación de la conservación de AfuA, IRP1-3 y Lip en aislados clínicos de <i>B. pertussis</i>	160
4.2.6	Estudio de la regulación de la expresión de AfuA, IRP1-3 y Lip por el regulador de virulencia de <i>B. pertussis</i> BvgAS .....	162
4.2.7	Evaluación de la localización celular de AfuA e IRP1-3 .....	164
4.3	Discusión .....	167
4.4	Conclusiones .....	173
	Referencias .....	175
<b>5.</b>	<b>Evaluación de la capacidad protectora de AfuA, IRP1-3 y Lip .....</b>	<b>181</b>
5.1	Introducción .....	181
5.2	Resultados .....	183
5.2.1	Puesta a punto del modelo de infección de ratones con <i>B. pertussis</i> limitada en hierro	183
5.2.2	Evaluación de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes AfuA e IRP1-3	184
5.2.3	Estudio de la respuesta humoral generada por inmunización con rAfuA o con rIRP1-3	186
5.2.4	Evaluación de la respuesta inmune celular generada por inmunización con rAfuA o con rIRP1-3 .....	188
5.2.5	Determinación de la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 .....	189
5.2.6	Evaluación de la contribución del agregado de rAfuA y de rIRP1-3 a la protección conferida por la vacuna Pa de tres componentes .....	191
5.2.7	Evaluación de la capacidad opsonofagocítica de sueros obtenidos por inmunización con Pa <sub>5AI</sub>	192
5.2.8	Estudio de capacidad protectora de rLip .....	193
5.3	Discusión .....	197
5.4	Conclusiones .....	203
	Referencias .....	205
<b>6.</b>	<b>Discusión General .....</b>	<b>211</b>
	Referencias .....	219



# Capítulo 1

## Introducción General

En el 75% de los casos, se cree que la causa de la fuente de contagio de pertussis, es alguno de los miembros de la familia.





## 1. Introducción General

### 1.1 Tos Convulsa

La tos convulsa es una enfermedad respiratoria severa, cuyo agente causal es el coccobacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis*. Esta bacteria es un patógeno estrictamente humano del cual no se conocen reservorios animales o ambientales. La infección transcurre en el tracto respiratorio y es sumamente contagiosa. Además de *B. pertussis*, de las nueve especies del género *Bordetella* identificadas, sólo tres, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii*, han sido asociadas con infecciones respiratorias en humanos y otros mamíferos [1].

La primera epidemia de la enfermedad se produjo en París y fue descrita por Guillermo de Baillou en 1578, quien la llamó tussis Quintín [2]. Posteriormente, Thomas Sydenham en 1679, y Thomas Willis en 1682 llamaron “pertussis” (per, intensa + tussis, tos) a esta enfermedad que afectaba fundamentalmente a lactantes y niños provocando la muerte en muchos casos. En el año 1906 Jules Bordet y Octave Gengou lograron aislar el agente causal de la tos convulsa [3], lo que permitió comenzar a desarrollar las primeras vacunas, sumamente necesarias debido al impacto epidémico de la enfermedad. Entre 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos exitosos de vacunación anti-pertussis [4]. En la década de 1940-1950 se introdujeron las vacunas celulares, lo cual redujo muy significativamente la incidencia de la enfermedad. Las reacciones adversas producidas por esta vacuna condujeron a una disminución en la aceptación de la vacuna, e incluso algunos países suspendieron la vacunación contra *B. pertussis* lo que determinó nuevos brotes epidémicos. La baja aceptación de la vacuna celular condujo a finales del siglo pasado, al desarrollo de vacunas de segunda generación acelulares compuestas por antígenos purificados.

La vacunación masiva a nivel mundial condujo a una gran disminución en el número de casos de tos convulsa. Sin embargo se han seguido registrando picos epidémicos cada 4 a 5 años, lo que indica que la inmunización controla la enfermedad pero no controla

la circulación del microorganismo en la población. Esta situación ha determinado que la tos convulsa continúe siendo una importante causa de muerte infantil a nivel mundial. Con la introducción de la vacuna acelular se registró un aumento progresivo, lento y sostenido de la incidencia de la tos convulsa. En la década del noventa la mayoría de los países con vigilancia activa detectaron un aumento alarmante en la incidencia de la enfermedad [5-13]. A fines de esa década la tos convulsa se convirtió en la cuarta causa de mortalidad infantil por enfermedades inmunoprevenibles, siendo declarada enfermedad reemergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Aunque la mayor incidencia de casos continúa siendo en infantes, datos epidemiológicos indican un cambio en el rango etario, con un aumento en el número de casos de tos convulsa asintomática o leve en adolescentes y adultos. Así, esta población constituye un reservorio importante y una continua fuente de transmisión para lactantes y niños con esquemas de vacunación incompletos [14, 15]. Las causas de la reemergencia de la enfermedad a nivel mundial aún no han sido determinadas, sin embargo se postula que la problemática podría ser una convergencia de distintos factores entre los cuales la corta duración de la inmunidad conferida por vacunación, diferencias entre el fenotipo infectante y el vacunal, y la inmunoselección de cepas genotípicamente diferentes de las cepas vacunales, juegan un papel importante.

El alarmante aumento de esta enfermedad a pesar de las altas tasas de vacunación pone de manifiesto la necesidad de esclarecer aspectos básicos del proceso infeccioso y caracterizar mejor el fenotipo infectante de *B. pertussis* con el fin de lograr un mejor diseño de vacunas y de estrategias de prevención que conduzcan a controlar esta enfermedad y lograr su eventual erradicación

## 1.2 Epidemiología

En países desarrollados con altas tasas de vacunación, se ha observado un cambio en la epidemiología de pertussis, registrándose un aumento en la incidencia de la enfermedad entre adolescentes y adultos, quienes han perdido la inmunidad por vacunación, y en infantes menores de 6 meses, quienes aún no cuentan con un esquema de vacunación completo [16]. La proporción de casos en pacientes mayores de 10 años de edad declarados por la CDC a finales de 1970 fue de 15,1%, mientras que en 1990 este número aumentó a



26,9% y en 2000 a 49% [17]. El decaimiento de la inmunidad luego de la vacunación o la infección, combinado con la ausencia de refuerzos regulares, ya sea mediante vacunación o exposición a la bacteria, explicaría este cambio en el rango etario de la incidencia de la tos convulsa [16].

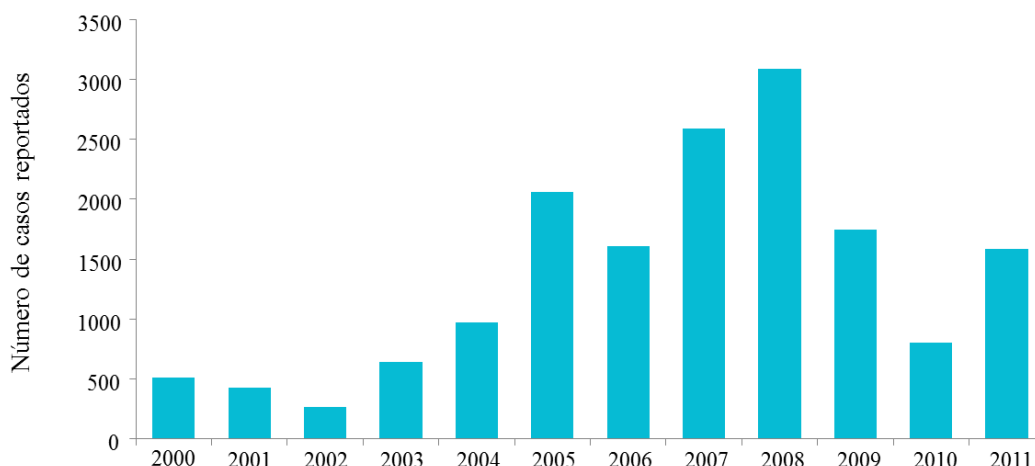
En la era pre-vacunal, las epidemias por pertussis ocurrían a nivel mundial y presentaban un patrón cíclico, con picos de incidencia cada 2 a 5 años [18]. La enfermedad afectaba principalmente a niños, los que representaban la mayor fuente de transmisión. Los adultos recibían refuerzos por repetidas exposiciones a la bacteria. Las madres transferían anticuerpos específicos a neonatos a través de la placenta durante el embarazo, quienes resultaban vulnerables a la infección cuando el nivel de estos anticuerpos decaía. Esto determinó que la tos convulsa fuera una de las mayores causas de mortalidad infantil en todo el mundo. Registros en Estados Unidos indican que sólo en ese país el número de casos reportados por año ascendía a más de 200000 [19]. La introducción de la vacuna celular entre los años 1940 y 1950, condujo a una drástica disminución en la incidencia de la enfermedad [19, 20]. Como consecuencia de la masiva vacunación a nivel mundial, la circulación de *B. pertussis* disminuyó, por lo que adolescentes y adultos reciben con menos frecuencia el refuerzo de la inmunización por infección. De esta forma, comenzó a observarse un aumento en el número de casos en adolescentes y adultos, en los que la inmunidad por vacunación ha declinado, y por lo tanto en neonatos, quienes no reciben una adecuada inmunización pasiva desde la madre [15]. Existen estudios que indican que esta población de individuos infectados constituye un reservorio importante [15, 21] y fuente de transmisión para los lactantes y niños con esquemas de vacunación incompletos [22-25].

La inmunización por vacunación a nivel mundial no ha modificado el patrón cíclico de aparición de la tos convulsa, ni el período que transcurre entre ciclos epidémicos, lo que sugiere que las vacunas de uso actual controlan la enfermedad, evitando la sintomatología asociada a la fase tóxica, pero no logran disminuir adecuadamente la circulación de *B. pertussis* en la población [26].

Como se menciona más arriba, el aumento sostenido en el número de casos de tos convulsa ha llevado a que la enfermedad haya sido declarada re-emergente. Distintos factores parecen haber contribuido a esta remergencia, entre los cuales se destacan la

deficiente inmunidad conferida por las vacunas actuales, esquemas de vacunación inadecuados [27, 28], la inmunoselección de cepas que presentan variantes polimórficas en antígenos vacunales [29], entre otros. La inmunoselección de cepas dirigida por vacunación ha llegado al límite de la aparición de cepas circulantes que presentan deleciones en algunos de los antígenos incluidos en las vacunas acelulares [30-32], lo cual evidentemente disminuye aún más la eficacia de las vacunas. A estas causas posibles de la falta de eficacia de las vacunas en uso se agrega un hallazgo relativamente reciente. Se ha observado que las condiciones de entorno previas y durante la transmisión de hospedador a hospedador inducen la disminución de la expresión de casi todos los antígenos vacunales en el fenotipo infectante [33, 34].

La situación epidemiológica en Argentina es similar a la del resto del mundo aunque había pasado inadvertida por años debido a la falta de notificación obligatoria. Nuestro grupo estuvo involucrado en la detección de *B. pertussis* en Argentina desde el año 2002. Desde entonces se organizó a través del grupo ViGiA del Ministerio de Salud de la Nación el relevamiento epidemiológico de esta enfermedad y la búsqueda sistemática en casos sospechosos. El relevamiento epidemiológico permitió detectar un incremento importante y sostenido en el número de casos reportados registrándose un brote muy importante de pertussis en la provincia de Neuquén en el año 2005 (Fig. 1). Recientemente, se registró un nuevo brote en esta provincia y otro brote en la provincia de Chaco. Los principales afectados fueron niños menores de 6 meses con esquemas de vacunación incompletos. Sin embargo también se observó un incremento en el número de casos en adolescentes y adultos [35]. Además, de manera similar a lo observado en otros países, relevamientos realizados en Argentina demostraron que las cepas circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas, como son toxina pertussis (PT) y pertactina (Prn) [36]. Más aún, se observó que las variantes polimórficas predominantes en nuestro país son las mismas que en el resto del mundo [36], lo cual sustenta la hipótesis de la inmunoselección de cepas circulantes dirigidas por vacunación.



**Figura 1. Número de casos de *B. pertussis* reportados en Argentina desde el año 2000 hasta el 2011.** Datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud.

Los estudios realizados hasta el momento no permiten atribuir la reemergencia a la aparición de cepas con variantes en los antígenos vacunales, pero en sí misma, la aparición de variantes antigénicas demuestra que *B. pertussis* nunca ha dejado de circular en la población, ni siquiera en poblaciones con un elevado estándar de vida y coberturas de vacunación cercanas al 100%, como es el caso de Europa, Estados Unidos y Canadá, entre otros.

### 1.3 Manifestaciones Clínicas

Según se ha descrito el ciclo infeccioso, una vez que la bacteria llega al hospedador hay un período de incubación de 7 a 10 días, antes del comienzo de la enfermedad. La fase sintomática dura entre 6 y 12 semanas, aunque este tiempo puede prolongarse. La enfermedad clásica presenta tres estadios clínicos: catarral, paroxístico, y de convalecencia [37]. Durante la fase catarral se presenta catarro, lagrimeo y tos suave. La tasa de contagio durante esta fase es muy elevada, lo mismo que en las dos

primeras semanas después de la aparición de la tos. A lo largo de este periodo la tos empeora en frecuencia y magnitud. La fase paroxística, que comienza en la segunda semana de la enfermedad, se caracteriza por ataques de tos repetidos con 5 o más expectoraciones violentas durante una exhalación simple (evento paroxístico). Al final del paroxismo, ocurre un esfuerzo de inspiración intenso durante el cual ocurre el clásico graznido que dio nombre a esta enfermedad. En conjunción con el paroxismo, se observa también cianosis, salivación, lagrimeo y vómitos. Los episodios de paroxismo ocurren generalmente en grupo cada una hora, tanto de noche como de día.

Entre las complicaciones comunes de esta enfermedad se incluyen: neumonía, otitis media, convulsiones, y encefalopatías. La neumonía puede ser un evento primario en respuesta a la infección por *B. pertussis* o puede resultar de una infección secundaria con otros patógenos. Las convulsiones y encefalopatía se deben probablemente a la hipoxia cerebral asociada con los paroxismos severos.

La fase paroxística dura entre 2 y 8 semanas, aunque a veces puede prolongarse. La transición a la fase de convalecencia es gradual y se asocia con la disminución en frecuencia y severidad de los eventos paroxísticos. La convalecencia usualmente dura entre 1 y 2 semanas.

En infecciones por contacto dentro de grupos familiares, los casos asintomáticos son comunes y se presentan como una enfermedad respiratoria leve (catarro, lagrimeo, estornudos, conjuntivitis, irritación de la garganta, o tos de menos de 2 semanas de duración) [38, 39]. En general, la mayoría de las infecciones asintomáticas o leves ocurren en niños previamente vacunados o en adultos que han sido vacunados en su niñez y eventualmente han sufrido previamente infecciones por *B. pertussis* [40-42]. En este último grupo etario el 21 % de los casos de tos persistente sin causa aparente se confirman finalmente como tos convulsa. La mayoría de los casos de muerte por infección con *B. pertussis* ocurren en infantes, especialmente durante el primer año de vida. La fuente de infección para infantes son frecuentemente adultos o adolescentes del propio grupo familiar [6, 43-45]. Las infecciones neonatales son particularmente severas, con un riesgo de muerte cercano al 3 % [46-49]. En estos casos, el síntoma inicialmente observado suele ser apnea, y las convulsiones debidas a la hipoxia resultante de la apnea son comunes. En infantes, la

severidad de la enfermedad y el riesgo de muerte muestran cierta correlación con la manifestación de leucocitosis. La tos convulsa causa linfocitosis aguda con recuentos de linfocitos que van desde 30000 a  $>100000$  células  $\text{ml}^{-1}$  [46, 50]. Hoy la tos convulsa es considerada la enfermedad contagiosa peor controlada entre las inmunoprevenibles por vacunación.

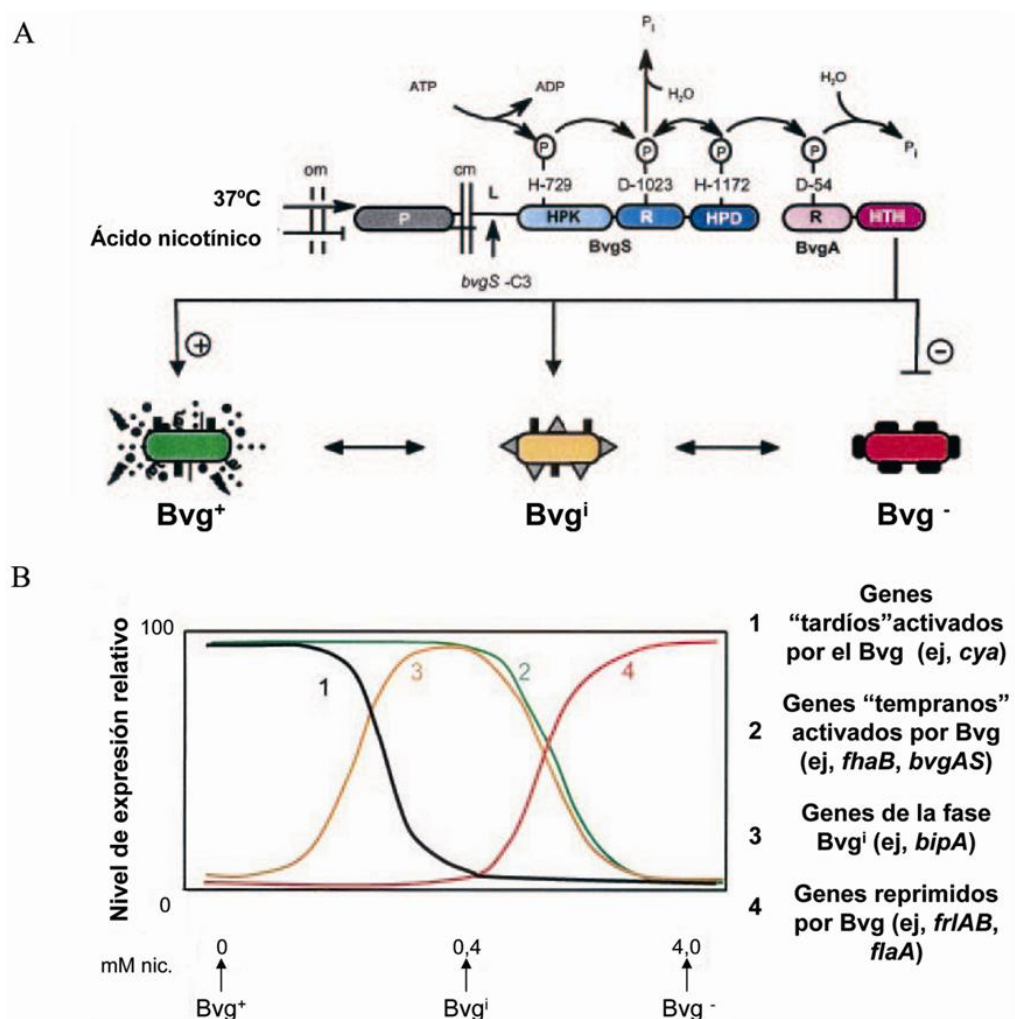
## 1.4 Factores de virulencia de *B. pertussis*

*B. pertussis* posee una gran variedad de factores de virulencia, algunos de función conocida y otros no. La expresión de la mayoría de estos factores de virulencia se encuentra regulada por las proteínas BvgS y BvgA, codificadas por el locus *bvgAS* (*Bordetella virulence genes*), las cuales constituyen un sistema de dos componentes que regula la variación en la expresión de distintos genes en respuesta a cambios ambientales. La activación de este sistema implica un mecanismo de fosfo-transferencia de cuatro pasos (His-Asp-His-Asp) [51, 52] que determina la expresión de una gran variedad de factores de virulencia (Fig. 2A). La proteína BvgS es un sensor híbrido anclado a la membrana interna [53] mientras que BvgA es un regulador transcripcional que se une al DNA [54], en la secuencia consenso heptamérica TTT(C/C)NTA [55], determinando la transcripción de los distintos factores de virulencia y de ella misma.

Estudios *in vitro* demostraron que el sistema BvgAS se inactiva a bajas temperaturas o en presencia de concentraciones milimolares de  $\text{MgSO}_4$  o ácido nicotínico y se activa cuando la bacteria crece a 37 °C. Es importante destacar, que esta regulación no es del tipo ON-OFF, sino que responde a los distintos moduladores a modo de reóstato, controlando la expresión de distintos genes en respuesta a variaciones sutiles en las condiciones de entorno [52, 56]. Aunque aparte de la temperatura no se conocen otros reguladores *in vivo* se cree que la regulación diferencial de los factores de virulencia en respuesta a los distintos ambientes encontrados tanto dentro del hospedador como durante la transmisión a otros hospedadores podría tener un rol importante en la patogénesis de esta bacteria.

Al menos tres fases fenotípicas han sido identificadas *in vitro*, Bvg+, Bvg<sup>i</sup> y Bvg- [55], que aparecen como respuesta a cambios graduales en las concentraciones de agentes

modulantes (MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico) o a cambios en la temperatura del cultivo (Fig. 2B). Este fenómeno de transición de fase es reversible y se conoce como modulación fenotípica [57]. Cuando la bacteria crece a 37 °C, en ausencia de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico, el BvgA es fosforilado (BvgA-P), induciendo la expresión de los genes *vag* (*virulence activated genes*). Simultáneamente, se reprime la transcripción de los genes *vrg* (*virulence repressed genes*) mediante la proteína BvgR, cuya expresión es activada por BvgA [58, 59]. En base a experimentos *in vitro*, los genes *vag* fueron clasificados en tres clases de acuerdo a diferencias en su expresión temporal: tempranos, intermedios y tardíos [60-62]. Los genes tempranos, que codifican algunas adhesinas (hemaglutinina filamentosa, FHA, y fimbrias, Fim) responden rápidamente a la activación y requieren bajas concentraciones de BvgA-P para su inducción [60]. Los genes tardíos codifican toxinas (adenilato ciclasa, CyaA, y toxina pertussis, PT) y presentan una cinética de inducción relativamente lenta, requiriendo mayores niveles de BvgA-P para su expresión [60]. Finalmente, el gen que codifica para pertactina (Prn) pertenece a la clase de genes intermedios, que requieren concentraciones intermedias de BvgA-P [63]. El locus *bvgAS* presenta auto-regulación y pertenece a los genes tempranos, lo que confiere un nivel de regulación adicional [64], e indica que BvgA induce su propia expresión. Un patrón de expresión similar fue observado *in vivo* [61], lo que le permitiría a la bacteria adaptar la expresión de sus factores de virulencia de acuerdo a los diferentes estadios de la infección o a los nichos en los cuales se encuentre. Cuando *B. pertussis* se cultiva a 25 °C, o a 37 °C en presencia de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico, se inactiva la fosforilación del BvgAS, por lo que es incapaz de activar la transcripción de los genes *vag*, mientras que los genes *vrg* se expresan debido a la ausencia del represor BvgR (fase Bvg- o avirulenta). El crecimiento microbiano en condiciones sub-modulatorias, por ejemplo, a concentraciones de ácido nicotínico entre 0,4 y 2 mM, determina que *B. pertussis* exprese un fenotipo intermedio entre el Bvg+ y el Bvg-, caracterizado por la ausencia de expresión de los genes *vrg*, la expresión de los genes *vag* tempranos [55] y genes expresados exclusivamente en esta fase [62], de los cuales la única proteína caracterizada se denomina BipA, la cual parece jugar un papel importante durante las primeras etapas de colonización de las vías respiratorias [65, 66].



**Figura 2. (A) Fosforilación de BvgAS.** BvgS posee dos dominios de unión a proteína de localización periplásmica que participan en el reconocimiento de la señal. A 37 °C, BvgS se autofosforila en la posición His729 del dominio autoquinasa. Este grupo fosfato es transferido a la posición Asp1.023 en el dominio receptor y luego pasa a la posición His1.172 en el extremo COOH-terminal del dominio de fosfotransferencia. Finalmente, el grupo fosfato pasa a la posición Asp54 de BvgA. La unión de BvgA~P a promotores transcripcionales determina la expresión de una gran variedad de factores de virulencia. En presencia de ciertos moduladores como son, las temperaturas por debajo de 25 °C, MgSO<sub>4</sub>, ácido nicotínico, etc, la fosforilación no ocurre. La expresión de los genes pertenecientes a la fase Bvg<sup>i</sup> parece estar regulada por la unión de BvgA~P a sitios de unión de alta y baja afinidad. **(B) Representación de las fases Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> y Bvg<sup>-</sup>.** Curvas

de expresión relativa de las cuatro clases de genes. (Fuente: Mattoo, S. et al. (2005) Clin. Microb. Rev.)

Ensayos en ratones empleando tecnología de expresión *in vivo* basada en el uso de recombinasa (RIVET) [61] permitieron evaluar el funcionamiento de este sistema de regulación *in vivo* en modelos animales y demostraron un patrón de expresión de FHA, Prn, PT y CyaA similar al observado *in vitro*, pero con tiempos de expresión más cortos, lo que sugiere que las condiciones de entorno que la bacteria encuentra dentro del ratón presentan una mayor capacidad de inducción de los genes regulados por el sistema BvgAS [61].

Se ha postulado que factores ambientales tales como la baja temperatura en la zona nasofaríngea y durante la transmisión de hospedador a hospedador, podrían determinar la modulación de la virulencia de manera tal que al ingresar al hospedador la bacteria se encontraría en fase intermedia o avirulenta [33, 34]. De ser así durante los primeros estadios de colonización este patógeno podría no expresar las proteínas codificadas por los genes *vag* (bacterias en fase avirulenta o Bvg<sup>-</sup>). Ya dentro del hospedador el cambio de temperatura induciría la expresión de adhesinas (Bvg<sup>i</sup>), lo cual favorecería la interacción con las células del epitelio respiratorio. Según ensayos *in vitro*, en condiciones de entorno favorable, a las dos horas de la inducción de adhesinas, comienza la expresión de toxinas propias de la fase virulenta, o Bvg<sup>+</sup>. Estas toxinas en general son las responsables de alterar los mecanismos de defensa del hospedador. La expresión de toxinas se relaciona con la fase aguda de la enfermedad y la sintomatología típica. Aunque no se conoce aún el rol de la modulación de éstos factores de virulencia durante el ciclo infeccioso, su conservación a lo largo de los años sugiere algún rol en la sobrevivencia bacteriana. En resumen, no se sabe exactamente cuál es la fase o fases predominantes a lo largo de la infección

No todos los factores de virulencia están regulados por el locus Bvg. Hay factores de virulencia regulados independientemente del sistema BvgAS y otros de expresión constitutiva que se mencionan más adelante.

Además del sistema BvgAS, *B. pertussis* presenta un segundo sistema de dos componentes regulador de la respuesta intracelular, denominado RisAS. Este sistema se



encuentra codificado en el locus *risAS*, que codifica para un regulador de respuesta RisA y un sensor con actividad quinasa RisS [67]. RisAS fue originalmente identificado en *B. bronchiseptica*, en la cual regula la expresión de distintos factores involucrados en la sobrevivencia intracelular [67], contribuyendo a la persistencia de la bacteria en el hospedador. En *B. pertussis* el gen *risS* contiene un corrimiento en el marco de lectura, lo que conduce a una proteína RisS truncada no funcional [68]. Sin embargo, este patógeno expresa una proteína RisA funcionalmente activa. La delección de *risA* conlleva a una fuerte disminución de la transcripción de los genes *vrg*, lo que sugiere que RisA juega un papel antagónico al de BvgR en la regulación de estos genes [68, 69]. Se ha postulado que, BvgR podría inhibir la expresión de los genes *vrg* previniendo la unión de RisA a los promotores de dichos genes, ya sea de forma directa compitiendo por la secuencia del promotor o indirectamente mediante la unión a RisA. También se ha postulado que BvgR podría interferir a través de la inactivación del c-di-GMP necesario para la acción de RisA sobre los promotores de los genes *vrg* [69]. De cualquier manera, el rol que juega RisA en la patogénesis de *B. pertussis* continua en estudio

#### 1.4.1 Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS

##### 1.4.1.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

FHA es una proteína fibrilar de 2-4 nm de diámetro y 100 nm de longitud, muy inmunogénica, que puede estar asociada a la superficie o ser secretada al medio extracelular [70]. FHA es codificada por el gen *fhaB*, que es un gen de expresión temprana, por lo que se expresa tanto en fase Bvg+ como Bvg<sup>i</sup> [71, 72]. La proteína es sintetizada como un precursor de 367 kDa, denominado FhaB, que sufre varias modificaciones hasta generar la proteína FHA madura de 220 kDa, la cual es exportada a través de la membrana citoplasmática por un sistema dependiente de péptido señal (*Sec signal peptide-dependent pathway*) [73, 74]. Su transporte y secreción a través de la membrana externa requiere la proteína accesoria FhaC, localizada en la membrana externa. Ambas proteínas conforman un sistema de secreción de dos componentes (*two-partner secretion (TPS) system*) [75]. Una vez localizada en la superficie celular, FHA puede ser liberada al medio extracelular a través del clivaje mediado por la proteasa SphB1 [76]. Estudios *in vitro* empleando

diferentes líneas celulares de mamíferos sugieren que FHA contiene al menos 3 dominios involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador. El triplete Arg-Gly-Asp (RGD) promueve la adhesión a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otros tipos celulares mediante la unión a integrinas (LRI,  $\alpha v\beta 3$  y IAP, CD47) y al receptor CR3 (CD11b/CD18,  $\alpha M\beta 2$ ), presentes en estos tipos celulares [77-79]. Específicamente, el dominio RGD de FHA participa en la unión a la integrina VLA-5 (*very late antigen 5*,  $\alpha 5\beta 1$ ) de células epiteliales bronquiales [80] y esta unión induce la activación de NF- $\kappa$ B, lo que conduce a un incremento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (*epithelial intercelular adhesión molecule 1*) [81, 82]. El aumento de ICAM-1 está involucrado en el reclutamiento de leucocitos y su activación en el sitio de infección. FHA también posee un dominio de interacción con carbohidratos (CRD), el cual media la adhesión a células epiteliales respiratorias ciliadas y macrófagos *in vitro* [83]. Además, FHA presenta actividad de unión tipo lectina con afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, que se encuentra involucrada en la adhesión a células epiteliales no ciliadas. Este sitio de unión a heparina es necesario para la hemaglutinación mediada por FHA [84]. Un hallazgo interesante recientemente descrito por nuestro grupo indica que la actividad adhesina de FHA se ve influenciada por la presencia de adenilato ciclasa (CyaA) en la membrana. Si CyaA no se encuentra expresada, como es el caso de *B. pertussis* en fase intermedia, la interacción de FHA con las células epiteliales es menos eficiente pero no se encuentra inhibida por heparina sugiriendo que CyaA modifica el dominio de unión de FHA a polisacáridos sulfatados [85].

#### 1.4.1.2 Fimbrias (Fim)

Las fimbrias son estructuras proteicas poliméricas de tipo filamentoso localizadas en la superficie de *B. pertussis*, conformadas por dos subunidades, una mayor y una menor. Existen dos serotipos de subunidad mayor de fimbria, Fim2 y Fim3, que comparten una subunidad menor común denominada FimD [86]. El gen *fimD* forma parte del operón *fimBCD*, el locus funcional para la biosíntesis de fimbria [87]. Estos también son genes de expresión temprana, por lo tanto Fim estará presente tanto en fase Bvg<sup>+</sup> como Bvg<sup>i</sup> [60]. Varios estudios sugieren que Fim interviene en la adhesión al epitelio respiratorio a través de Fim2 y Fim3, y a monocitos por medio de FimD [88, 89]. Fim interacciona también con

azúcares sulfatados que se encuentran comúnmente en el tracto respiratorio, como heparina, condroitin y dextrano [90]. Estudios realizados por Hazenbos y colaboradores [88, 91], sugieren que FimD interviene en la adhesión de *B. pertussis* no opsonizada a VLA-5 en la superficie de monocitos provocando un aumento de expresión de CR3 e incrementando los sitios de interacción para FHA.

Se ha encontrado que la inclusión de Fim en las formulaciones vacunales acelulares aumenta la eficacia de las mismas y que los anticuerpos anti-Fimbria contribuyen a la protección contra *B. pertussis* [92, 93]. Nuestro grupo demostró que la actividad protectora de los anticuerpos anti-Fim está basada en su gran actividad aglutinante, la cual interfiere significativamente en la capacidad de *B. pertussis* de interaccionar con las células epiteliales respiratorias y promueve la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio [94].

#### 1.4.1.3 Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores

*B. pertussis* expresa distintas proteínas asociadas a la superficie que pertenecen al sistema de secreción de autotransportadores. La familia de autotransportadores incluye diversas proteínas funcionalmente diferentes, como proteasas, adhesinas, toxinas, lipasas e invasinas cuya característica distintiva es que dirigen su propia exportación a través a la membrana externa [95]. El primer miembro de esta familia descrito en *Bordetella* fue Prn. Como ya se mencionó, *prn* es un gen de expresión intermedia, y por lo tanto estará expresado tanto en fase Bvg<sup>+</sup> como Bvg<sup>i</sup> [60]. Prn es una proteína de 69 kDa que posee un motivo RGD, así como regiones ricas en prolina y repeticiones de leucina, ambos dominios potencialmente involucrados en la adhesión de la bacteria a células del hospedador [95, 96]. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sugieren que anticuerpos anti-Prn juegan un rol crucial en la protección contra *B. pertussis* debido a su capacidad opsonizante, capaz de promover la inmunoeliminación mediada por células [97, 98]. En estos estudios se observó además que Prn es el único antígeno incluido en las formulaciones de vacunas acelulares actuales que induce anticuerpos opsonofagocíticos [97], lo cual explica la importancia de su inclusión en tales vacunas [99] y, tal vez, la aparición de cepas circulantes que expresan Prn con variaciones en regiones implicadas en el reconocimiento inmune [29] o incluso cepas que carecen de la expresión de este antígeno [30-32].

Otras proteínas autotransportadoras identificadas como factores de virulencia de *B. pertussis* incluyen: TcfA, originalmente clasificada como un factor de colonización traqueal [100], BrkA [101], SphB1 [76] y Vag8 [102]. BrkA le confiere a *B. pertussis* cierta resistencia a la activación de la vía clásica del complemento [101, 103] y ha sido demostrado que genera cierto grado de protección en combinación con vacunas acelulares actuales [104]. SphB1, como ya se indicó, es una proteasa que media la liberación de FHA al medio extracelular [76]. La función de Vag8 aún se desconoce.

#### 1.4.1.4 Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA)

CyaA es una proteína bifuncional con actividad adenilato ciclasa y hemolisina. Es una proteína de expresión tardía por lo que únicamente estará presente en la bacteria en fase virulenta, Bvg<sup>+</sup> [60]. CyaA pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poros y dependientes de calcio denominadas toxinas RTX (*repeats-in-toxins*) [105, 106]. CyaA es sintetizada como una pro-toxina monomérica a partir del gen *cyaA*. Su actividad catalítica adenilato ciclasa se localiza dentro de los 400 aminoácidos del extremo amino, mientras que los 1.300 aminoácidos restantes del extremo carboxilo poseen la actividad hemolítica y participan en la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de células eucariotas [107-110]. El resto de los genes del operon *cyaABCDE* participan en la secreción y activación de CyaA. A diferencia de otras toxinas de su clase, la mayor parte de CyaA permanece asociada a la superficie y solo una pequeña proporción se libera al medio externo. Existen estudios que indican que FHA juega un rol importante en la retención de CyaA en la superficie bacteriana [111]. La glicoproteína de superficie CD11b de las células eucariotas sirve de receptor de la toxina madura [112, 113]. Una vez que ingresa a la célula blanco, CyaA es activada por calmodulina [114] y cataliza la producción de cantidades suprafisiológicas de AMPc a partir de ATP [115-118]. Sorprendentemente, CyaA anclada en la membrana bacteriana no es responsable de la intoxicación de las células del hospedador; estudios recientes demostraron que la intoxicación requiere el contacto entre la bacteria viva y la célula blanco, y la secreción activa de CyaA [119]. El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la persistencia bacteriana [120]. *In vitro*, CyaA induce apoptosis en macrófagos y

disminuye la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos y neutrófilos [118, 121, 122]. Se ha postulado que esta toxina funciona como un factor anti-inflamatorio y anti-fagocítico durante la infección inhibiendo las funciones de las células efectoras del sistema inmune.

#### 1.4.1.5 Toxina Dermonecrótica (DNT)

DNT, es una toxina de tipo A-B compuesta de un dominio de 54 aminoácidos amino-terminal de unión al receptor y un dominio enzimático de 300 aminoácidos carboxilo-terminal [123, 124]. *In vitro*, DNT causa la poliaminación y desaminación de GTPasas Rho intracelulares, lo que las vuelve constitutivamente activas [125, 126]. Estas GTPasas regulan varios procesos celulares incluyendo la reorganización del citoesqueleto y diferenciación celular entre otros [127] y su activación constitutiva por la DNT provoca la intoxicación celular. Aunque el receptor de DNT no ha sido identificado, se sabe que esta toxina es internalizada vía endocitosis y luego clivada por proteasas de la células eucariota como furina, lo cual es indispensable para su actividad [128].

#### 1.4.1.6 Toxina Pertussis (PT)

Esta toxina es sintetizada y secretada exclusivamente por *B. pertussis* y posee la estructura clásica tipo A-B de las exotoxinas bacterianas. Es una proteína de expresión tardía por lo que únicamente estará presente en la bacteria en fase virulenta, Bvg<sup>+</sup> [60]. PT está compuesta por seis polipéptidos designados S1 a S5, codificados por los genes *ptxA* a *ptxE*, respectivamente [129, 130]. El polipéptido S1 constituye la subunidad A de la toxina mientras que la subunidad pentamérica B está compuesta por los péptidos S2, S3, S4 y S5 ensamblados en una proporción 1:1:2:1 [130, 131]. La secreción a través de la membrana externa requiere un aparato de transporte especializado compuesto por nueve proteínas denominadas Ptl (*pertussis toxin liberation*) [132, 133]. Una vez dentro del citoplasma de la célula eucariota, probablemente vía endocitosis mediada por receptores, la subunidad B se intercala dentro de la membrana citoplasmática y une ATP, provocando la liberación de la subunidad activa S1 [134]. Esta subunidad cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD a la subunidad  $\alpha$  de proteínas G (Gi, Gt y G0) provocando su inactivación [131, 135]. Cuando se encuentra activa, la proteína Gi inhibe la adenilato ciclasa eucariota y abre

canales de  $K^+$ , la proteína Gt activa la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis del GMP cíclico y G0 produce la apertura de canales de  $K^+$ , el cierre de canales de  $Ca^{+2}$  y activa la fosfolipasa C- $\beta$ . Los efectos biológicos atribuidos a la alteración de los patrones de señalización que esta toxina provoca se suman a la acción de CyaA (aumento de AMPc) provocando la sensibilización a histamina, linfocitosis, aumento de la secreción de insulina en respuesta a señales reguladoras, hipoglucemia y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores [122]. Por ejemplo, PT retarda el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección reduciendo la capacidad de los anticuerpos opsonizantes anti-*B. pertussis* de mediar la eliminación de la bacteria [136, 137]. Además se ha encontrado que PT interfiere con la expresión de moléculas presentadoras de antígeno en el macrófago [138] e incrementa la expresión de CR3 en estas células [139], favoreciendo así la unión de *B. pertussis* a través de FHA. PT también altera la expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas [140] reduciendo la respuesta adaptativa y promoviendo la re-infección de individuos.

#### 1.4.2 Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS

##### 1.4.2.1 Citotoxina Traqueal (TCT)

TCT es un producto resultante de la degradación del peptidoglicano que es producido por todas las bacterias Gram-negativas y liberado durante el crecimiento. A diferencia de otras bacterias Gram-negativas, que reciclan el peptidoglicano por transporte al citoplasma vía la proteína integral de membrana AmpG, *Bordetella spp.* libera este producto al medio externo debido a que carece de AmpG [141, 142], por lo que TCT se expresa de forma constitutiva e independientemente del sistema BvgAS. TCT causa disfunción (ciliastosis) y muerte de células epiteliales ciliadas [143]. La destrucción de las células ciliadas está relacionada con el incremento en la producción de óxido nítrico (ON) [144]. Se ha postulado que, *in vivo*, TCT estimula la producción de IL-1 $\alpha$  en células secretoras de mucus no ciliadas, lo cual controla positivamente la expresión de la enzima ON sintetasa. Esto conduciría a una elevada producción de ON que luego difunde a las células ciliadas vecinas, más susceptibles a sus efectos tóxicos [144]. El óxido nítrico provoca la depleción del hierro intracelular lo cual deriva en la inactivación de enzimas que

contienen hierro importantes para la respiración mitocondrial y la síntesis de DNA. Como resultado de esta intoxicación celular, la unión entre células epiteliales se ve comprometida y ocurre la extrusión de células ciliadas.

#### 1.4.2.2 Lipopolisacárido (LPS)

Como otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee LPS en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. La misma está constituida por una parte lipídica (lípidio A) anclada a la membrana y un núcleo oligosacárido. *B. pertussis* no posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. El locus *wlb*, compuesto por doce genes (*wlbA* a *wlbL*) codifica las enzimas involucradas en su biosíntesis y ensamblado [145]. El LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante, siendo el lípidio A de esta molécula la fracción endotóxica principal [146-148]. En combinación con otras toxinas activas, especialmente PT, LPS es responsable de la reactogenicidad y efectos adyuvantes de la vacuna celular. En contacto con células epiteliales, macrófagos y otras células del sistema inmune induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 y IL-8) lo cual conduce a la toxicidad sistémica o “shock inducido por endotoxina” [148]. Por otra parte, el LPS protege a *B. pertussis* de los efectos de la proteína surfactante A (SP-A) presente en el epitelio respiratorio [149]. Presumiblemente, la particular conformación (ausencia de antígeno O) del LPS, impide a SP-A interactuar con esta molécula obstaculizando la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio. TCT actúa sinérgicamente con LPS induciendo la producción de ON en el epitelio respiratorio [150]

#### 1.4.2.3. Sistemas de Captura de Hierro de *B. pertussis*

En mamíferos, el hierro intracelular se encuentra en la forma de hemoproteínas, mientras que el Fe extracelular se haya unido a glicoproteínas, como transferrina (TF) en el suero y lactoferrina (LF) en otras secreciones [151] dejando una concentración de hierro libre tan baja que no es capaz de sostener el crecimiento microbiano. Este es considerado un mecanismo de defensa del hospedador. Por esta razón, la adquisición de hierro es uno de los mayores desafíos que los patógenos de mamíferos deben enfrentar dentro del

hospedador. Los patógenos y otros organismos que proliferan dentro de mamíferos superan esta limitación nutricional impuesta por el huésped a través de la expresión de sistemas de captura de hierro de alta afinidad capaces de extraer el hierro complejo por las proteínas del huésped. Por esta razón estos sistemas suelen considerarse factores de virulencia y blanco de estrategias preventivas. Existen distintas clases de sistemas de captura de hierro pero básicamente pueden dividirse en dos tipos. Hay microorganismos que expresan uno u otro, y están aquellos que expresan ambos. Brevemente, existen sistemas que involucran receptores específicos en la superficie de la bacteria que remueven el hierro directamente de la TF, LF o hemoproteínas del huésped [152-155]. El otro tipo importante es un sistema de captura de hierro de alta afinidad mediado por complejantes de hierro de bajo peso molecular, denominados sideróforos. Los microorganismos producen y secretan sideróforos, o utilizan sideróforos derivados de otros microorganismos [156]. Los sideróforos poseen una gran afinidad por el hierro, lo que les permite extraer este metal de las proteínas quelantes presentes en el hospedador. En estos casos las bacterias tienen receptores de sideróforos que les permiten recuperarlos y transportarlos al interior de la célula donde extraen el hierro que estos transportan.

La interacción de *B. pertussis* con el hospedador produce inflamación, activación del sistema inmune y daño tisular, lo que conduce a cambios en la fuente de hierro que la bacteria encuentra a lo largo del curso de la infección. En este complejo ambiente, *B. pertussis* es capaz de obtener el hierro necesario para el crecimiento. Uno de los mecanismos que este patógeno utiliza para obtener este nutriente, es la producción de alcaligina, un sideróforo tipo hidroxamato. También es capaz de utilizar sideróforos producidos por otras bacterias comensales o colonizadoras temporarias de la cavidad nasofaríngea (xenosideróforos). A medida que progresa la infección, la extravasación de células inmunes, eritrocitos y suero a la superficie de la mucosa se ve exacerbada. El suero y la lisis celular proveen nuevas fuentes de hierro para la bacteria, como por ejemplo transferrina o compuestos con grupos hemo tales como hemoglobina que puede ser usada como fuente de hierro gracias a la expresión de un tercer sistema de captura de hierro capaz de extraer hierro del grupo hemo, cuya síntesis se ve inducida en presencia de sustrato [157]. Hasta el momento no se ha descrito que *B. pertussis* tenga receptores capaces de



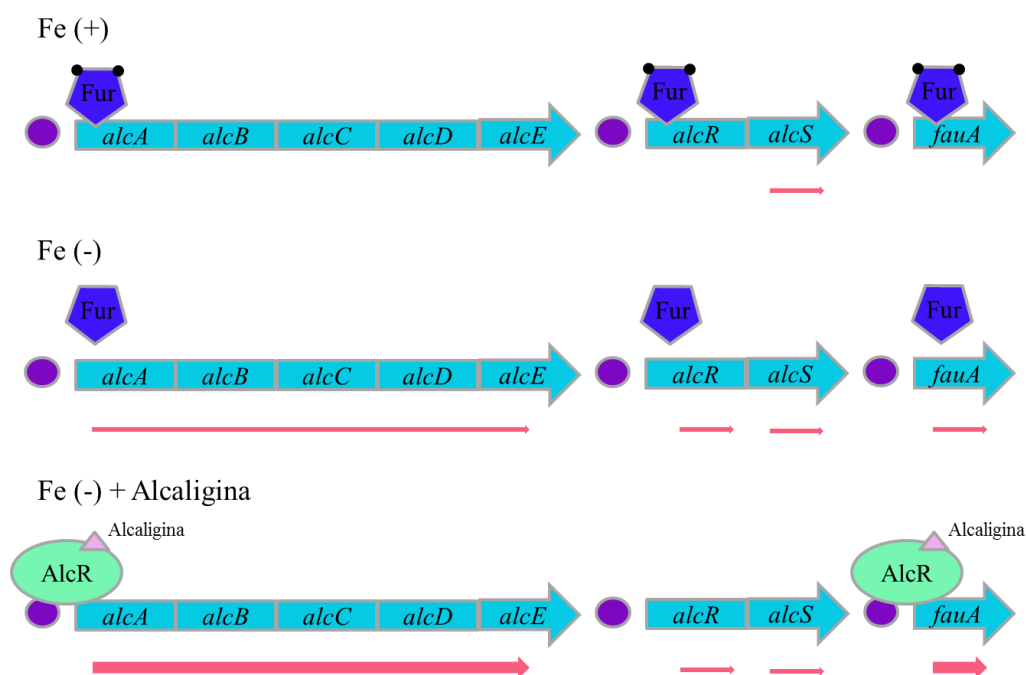
extraer el hierro directamente de TF o LF. El análisis del genoma tampoco ha arrojado posibles receptores de este tipo.

Un aspecto importante de la utilización del hierro es que, aunque el hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos vivos, su acumulación puede resultar toxica debido a que puede conducir a la producción de radicales libres [158] y por lo tanto los niveles intracelulares de hierro están bajo estricto control. En *B. pertussis*, así como en otras bacterias Gram-negativas, la expresión de la mayoría de los genes que codifican para sistemas de captura de hierro se reprime cuando la concentración intracelular del metal aumenta [159]. El regulador transcripcional Fur (*Ferric uptake regulator*) que emplea hierro como co-represor cumple esta función [160]. En presencia de hierro, Fur se une a secuencias conservadas de DNA (cajas Fur) utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  como cofactor y así reprime la expresión de genes involucrados en la captura del metal. Cuando la bacteria se encuentra en un entorno limitado en hierro, su reserva intracelular del metal se agota, y el regulador Fur no es capaz de unirse al DNA resultando en la de-represión de los genes para la adquisición de hierro [159]. A continuación se detalla lo que se conoce de la respuesta de *B. pertussis* a la baja disponibilidad de hierro libre y su adaptación a este entorno

### *Sideróforo Alcaligina*

El sideróforo tipo hidroxamato alcaligina [161] une  $\text{Fe}^{3+}$  en una relación molar 3:2 ( $\text{Fe}_2\text{Alc}_3$ ) a pH fisiológico. El cluster de genes que codifica para el sistema alcaligina de *B. pertussis* se compone de cuatro unidades transcripcionales distintas: *alcABCDER*, que codifica enzimas involucradas en la biosíntesis del sideróforo; el *alcR*, que codifica para un regulador transcripcional inducible por sustrato [162-164]; el *alcS*, que codifica para la proteína exportadora de alcaligina [165]; y *fauA*, que codifica para un receptor de membrana externo que transporta la alcaligina férrica al interior celular [166]. El gen *alcS* se encuentra localizado inmediatamente corriente abajo del operon *alcABCDER*, y su expresión es independiente de la región que controla dicho operón y no reprimible por hierro [167]. *AlcS* codifica una permeasa que exporta monómeros de alcaligina fuera de la bacteria, por lo que su expresión es importante para la excreción del sideróforo recién sintetizado [165]. Así, *AlcS*, mediante su actividad exportadora, mantiene los niveles de alcaligina intracelulares controlados, ya que su acumulación resultaría toxica para la

bacteria. El ingreso de alcaligina férrica al interior de la bacteria, mediado por el receptor FauA, requiere del sistema TonB [162, 166, 168]. El complejo TonB/ExbB/ExbD, referido como sistema TonB, interactúa con la mayoría de los receptores de membrana externa involucrados en la captura de hierro y provee la energía requerida para la transferencia de  $\text{Fe}^{+3}$  al periplasma [159, 169]. La expresión del operon *tonB-exbBD* de *B. pertussis* se activa también en condiciones de limitación en hierro [170]. Tanto el gen *fauA* como el operón *alcABCDER* se transcriben a partir de su propio promotor regulado por Fur, que a su vez son activados por el regulador AlcR en respuesta a la inducción por alcaligina (Fig. 3). El gen que codifica AlcR, *alcR*, también posee un promotor regulado por Fur. Cuando la represión mediada por la proteína Fur se libera en limitación de hierro, la expresión de *fauA* y del operon *alcABCDER* es activada por AlcR mediante un mecanismo que requiere la inducción por alcaligina [163] (Fig. 3). De esta manera, AlcR funciona como un regulador, inducible por sustrato, de la biosíntesis de alcaligina y su transporte. La activación transcripcional mediada por AlcR requiere alcaligina como inductor formando así un circuito de control autógeno positivo que controla su propia síntesis y transporte.



**Figura 3. Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del sistema**

**alcaligina de *B. pertussis*.** En presencia de hierro [Fe (+)] la proteína represora Fur impide la transcripción de los genes *alcR* y *fauA* y del operón *alcABCDER*. En ausencia de hierro [Fe (-)] se libera la proteína Fur del promotor y se activa la transcripción de dichos los genes. La ausencia de hierro induce la expresión basal del gen *fauA* y del operón *alcABCDER* necesario para la biosíntesis de alcaligina. En ausencia de hierro y presencia de alcaligina [Fe (-) + Alcaligina], la misma actúa como inductor y la transcripción del gen *fauA* y del operón *alcABCDER* alcanza el máximo nivel. (Fuente Tesis Doctoral Dra. Ma. Laura Perez Vidakovics, 2007).

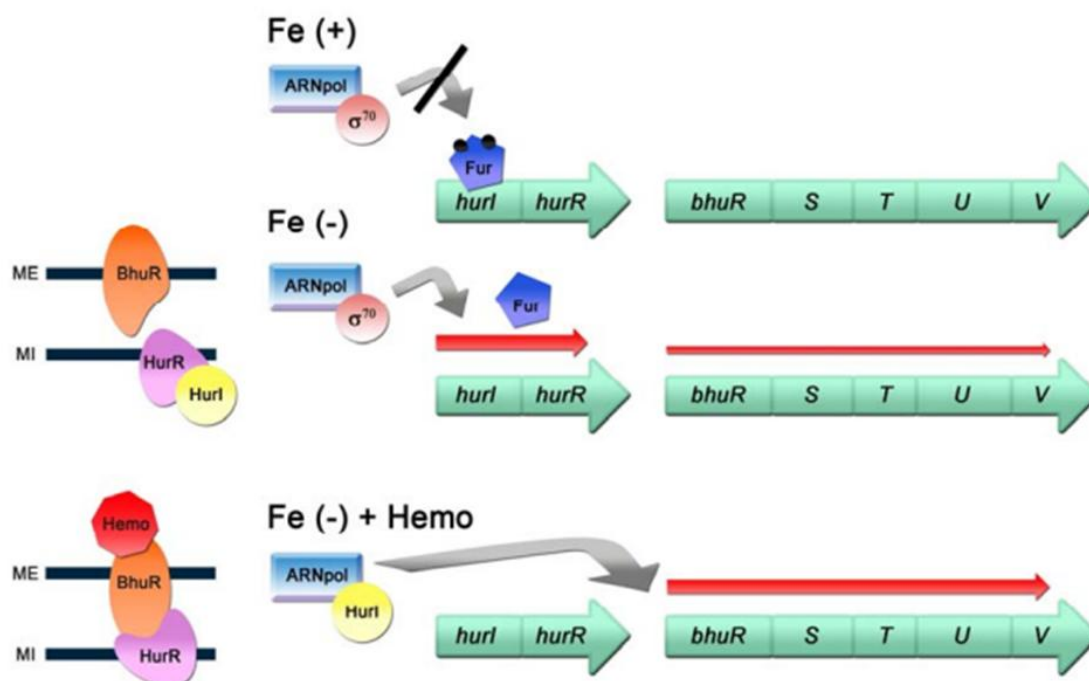
### *Xenosideróforo Enterobactina*

*B. pertussis* no produce enterobactina, pero es capaz de utilizar enterobactina excretada por otras especies bacterianas. La adquisición de un nutriente limitante sin el costo energético de la biosíntesis y secreción de un sideróforo representa una ventaja competitiva importante para la bacteria. Para el transporte y utilización de enterobactina férrica es necesario el receptor de membrana externa BfeA, el cual se encuentra regulado por la proteína Fur [171]. Corriente abajo de *bfeA* se encuentra el gen *bfeB*, que codifica para una hidrolasa posiblemente involucrada en el transporte de enterobactina a través de la membrana citoplasmática [159], y sería co-transcripto con *bfeA*. El gen *bfeR*, cuya transcripción es independiente de la de *bfeA*, codifica para un regulador que presenta alta homología con AlcR. Bajo limitación de hierro, la expresión de *bfeA* y *bfeB* es inducida, en presencia de enterobactina, mediante un mecanismo dependiente de BfeR [172].

### *Utilización de grupos hemo*

*B. pertussis* es capaz de utilizar hemina y hemoglobina como fuente de hierro mediante un mecanismo TonB-dependiente [170, 173]. Los genes que codifican proteínas involucradas en el transporte y utilización de estos compuestos se agrupan en el cluster *hurIR bhuRSTUV* (*Bordetella heme utilization*) [157, 174]. Los genes *bhu* de *B. pertussis* codifican proteínas necesarias para el transporte y la utilización de grupos hemo. BhuR es el receptor de membrana externa para moléculas de hemina (grupo hemo), que forman parte de la estructura de hemoproteínas como hemoglobina o mioglobina. La producción de este

receptor en bacterias sometidas a limitación de hierro se incrementa en presencia de hemo [157]. Las proteínas putativas BhuT, una proteína de unión a hemo periplásmica, BhuU, una permeasa de membrana citoplasmática y BhuV, una proteína de unión a ATP, participarían en la internalización del grupo hemo. La proteína BhuS se asemeja a la proteína ShuS de *Shigella dysenteriae*, la cual secuestraría el hemo internalizado evitando la toxicidad por acumulación citoplasmática [175]. La proteína HurI es un factor  $\sigma$  ECF (*extracytoplasmatic function*) y HurR es el factor anti- $\sigma$  localizado en la membrana citoplasmática [157]. Los genes *hurI* y *hurR* se localizan inmediatamente corriente arriba del locus *bhuRSTUV*. El promotor del gen *hurI* es reprimido por Fur. La traducción originada en *hurI*, continúa a través de la región *hurR-bhuR*, lo que contribuye a la expresión de *bhuR* bajo limitación de hierro y en ausencia de hemo [174]. Así, cuando *B. pertussis* se enfrenta a condiciones de limitación de hierro, la de-represión de Fur del promotor de *hurI* activa la transcripción de *hurIR* y de *bhuRSTUV* (Fig. 4). Esto permite la producción de niveles basales de la maquinaria de transporte de grupo hemo, incluido el receptor BhuR requerido tanto para censar hemo como para el transporte de hemo al interior de la bacteria. En estas condiciones, el factor anti- $\sigma$  HurR se encontraría unido a HurI manteniéndolo en un estado inactivo. Cuando el receptor de membrana externa BhuR une hemo, la señal se transmite a través del periplasma vía el contacto entre BhuR y HurR. La interacción BhuR-HurR libera el factor HurI permitiendo su asociación con la ARN polimerasa y la transcripción de *bhuR*. Así, los genes *bhu* son regulados positivamente por HurIR, BhuR y hemo.



**Figura 4. Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del operon *hurIR/bhuRSTUV* de *B. pertussis*.** En presencia de hierro [Fe (+)] la proteína Fur impide la transcripción de los genes *hurIR*. La transcripción de los genes *hurIR* se activa en ausencia de hierro [Fe (-)]. En estas condiciones se detectan niveles basales de transcripción del operon *bhuRSTUV*, lo cual permite la producción de la maquinaria de transporte de grupo hemo incluido el receptor BhuR. En ausencia de hierro y presencia de grupo hemo, el receptor BhuR une hemo. La señal se transmite a la proteína citoplasmática HurR asociada al receptor BhuR en la membrana interna. Esto libera al factor sigma HurI, el cual se une a la ARN polimerasa y activa la transcripción del operón *bhuRSTUV* a nivel máximo. (Fuente Tesis Doctoral Dra. Ma. Laura Perez Vidakovics, 2007)

#### *Receptores y transportadores de hierro*

El análisis del genoma de *B. pertussis* permitió identificar múltiples genes que codificarían potenciales sistemas de captura de hierro. Además de los receptores conocidos

FauA, BfeA y BhuR, *B. pertussis* posee otros 9 genes que presentan homología con receptores dependientes de TonB expresados por otras bacterias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Receptores de *B. pertussis* dependientes de TonB involucrados en la captura de hierro

Receptor	ORF	Fuente de hierro, homología
BfrB	BP2016	ND, <i>Y. enterocolitica</i> receptor FcuA Q05202
BfrC	BP3663	ND, <i>Vibrio anguillarum</i> receptor FatA P11461
BfrD	BP0856	ND, <i>P. aeruginosa</i> Fiu Pa4514
BfrE	BP0857	ND, <i>P. aeruginosa</i> Fiu Pa4514
BfrF	BP0736	ND, <i>E. coli</i> FhuA NP_414692
BfrG	BP2922	ND, <i>E. coli</i> FhuA NP_414692
BfrH	BP1138	ND, <i>E. coli</i> FhuA, Burkholderia cepacia OrbA, AF013993
BfrI	BP1962	ND, <i>P. aeruginosa</i> FiuA AF051691; <i>Salmonella typhimurium</i> FhuA Y14025
HemC	BP0456	ND, <i>Haemophilus ducreyi</i> TdhA receptor hemo AAC35765

ND, No Determinada

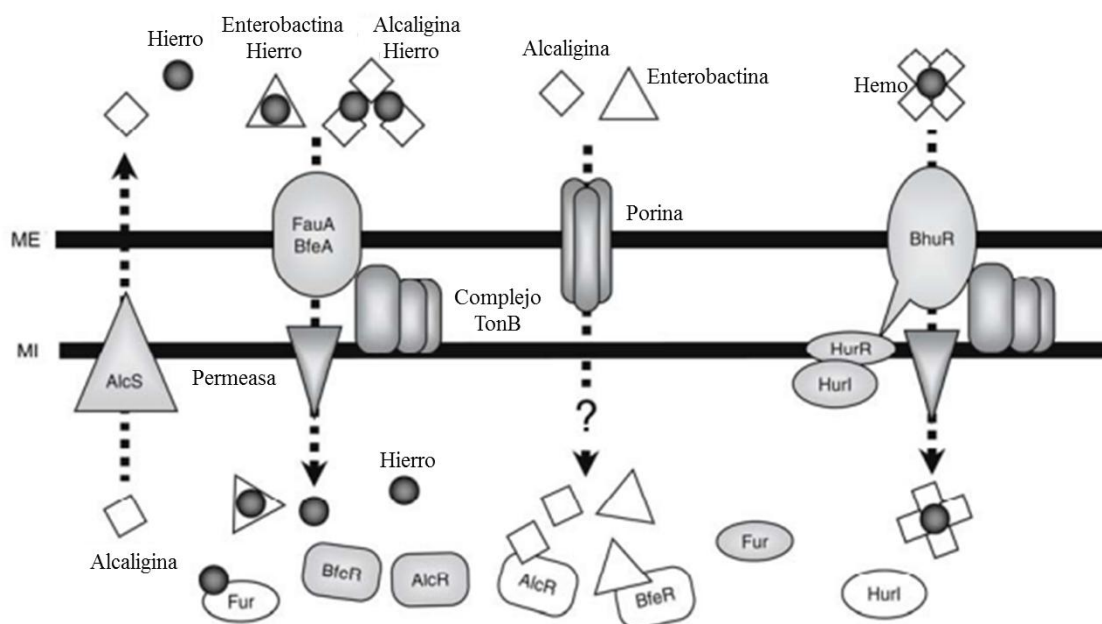
Mediante proteómica comparativa, nuestro grupo demostró la expresión de BfrI y BfrB, y de dos proteínas, denominadas AfuA e IRP1-3 [176], las cuales, según se demostró recientemente [177, 178], desempeñan funciones vitales para la bacteria en el transporte de hierro.

#### *Expresión diferencial de los sistemas de captura de hierro a lo largo del proceso de infección*

Como se mencionó anteriormente, cambios en el epitelio del tracto respiratorio del hospedador causados por los factores de virulencia expresados por *B. pertussis*, determinan que las fuentes y la disponibilidad de hierro vayan variando a lo largo del curso de la infección. De lo que se conoce se puede deducir que el hecho de que la expresión los distintos sistemas de captura de hierro presentes la bacteria se encuentre controlada por un

regulador transcripcional inducible por sustrato propio (AlcR, BfeR o HurI), asegura que *B. pertussis* exprese cada sistema de forma diferencial de acuerdo a la fuente de hierro disponible, adaptándose así al entorno ofrecido por el hospedador (Fig. 5). Cada una de las señales o inductores (hierro, sideróforos, hemo) es utilizada para integrar la información que procede de las condiciones de entorno del patógeno, de modo de priorizar la expresión de sistemas de captura de hierro más efectivos (Fig. 5). La expresión de estas proteínas es crítica para la supervivencia de *B. pertussis* y la colonización del hospedador.

Esta hipótesis fue corroborada por Brickman y col. [179]. Mediante el uso de la tecnología de expresión *in vivo* basada en el uso de recombinasa (RIVET), estos investigadores demostraron que *B. pertussis*, tal como se esperaba, se encuentra limitada en hierro durante la infección y que los sistemas de sideróforos alcaligina y enterobactina están inducidos en estadios tempranos de la infección, mientras que el sistema de captura de hemo se induce en estadios más avanzados [179].



**Figura 5. Sistemas de captura de hierro de *B. pertussis*.** La respuesta a las fluctuaciones en la disponibilidad de hierro se controla mediante un complejo sistema que involucra la proteína represora Fur, el regulador transcripcional positivo AlcR, el regulador transcripcional de los genes involucrados en la utilización de enterobactina BfeR, y los reguladores positivos de la expresión de

los genes para la utilización de hemo HuriR. La producción de los reguladores positivos es reprimida por Fur, sujeta a la disponibilidad de su co-represor hierro, y la actividad de estos reguladores positivos es modulada por la presencia de sus inductores específicos. En el caso de los reguladores AlcR y BfeR, la señal inductora (deferrisideróforos) se percibe intracelularmente, mientras que la expresión del factor Sigma ECF Huri se activa cuando el receptor extracelular de hemo BhuR une hemo. BfeR y AlcR responden a sus inductores, enterobactina y alcaligina respectivamente, los cuales son internalizados por un mecanismo desconocido e independiente de sus respectivos receptores de membrana TonB-dependientes BfeA y FauA respectivamente. La exportación de alcaligina mediante la proteína AlcS es fundamental en el proceso de detección de esta molécula dado que modifica la concentración intracelular de este inductor. (Fuente: Brickman, T. J. et al. (2007) Biometals).

## 1.5 Patogénesis

La colonización del epitelio implica una compleja serie de eventos entre los que se incluye la adhesión, la evasión de las defensas del huésped, la multiplicación bacteriana, seguida generalmente de daño tisular y la eventual invasión celular que finalmente podría conducir a la persistencia del microorganismo dentro del hospedador. Estos eventos son modulados por la interacción de los factores de virulencia con los receptores celulares del hospedador, un fenómeno multifactorial y dinámico donde las señales se transmiten desde el patógeno hacia el hospedador y viceversa.

En el caso de *B. pertussis*, la infección se inicia con la adhesión a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Varios factores de virulencia regulados por el BvgAS tienen características que las señalan como potenciales adhesinas (FHA, Fim, PT, TcfA, BrkA, Vag8, y Prn) [37]. De cualquier manera, numerosos estudios han demostrado que FHA es la adhesina más importante en fase virulenta [77-80, 83]. En ausencia de FHA la adhesión bacteriana a epitelio respiratorio es despreciable aún en presencia de las otras supuestas adhesinas menores reguladas por el BvgAS. Sin embargo, aparte de las adhesinas reguladas por el BvgAS existen otras adhesinas importantes que se inducen *in vivo* [180]. Estas adhesinas se expresan en cualquier estado de virulencia si la bacteria crece en limitación de hierro, condición de entorno que encuentra dentro del hospedador. Estudios previos nos permitieron demostrar que estas adhesinas se expresan *in vivo* y son capaces



que mediar la adhesión bacteriana a células epiteliales aún en ausencia de FHA [180]. De esta forma aunque la bacteria llegue al hospedador en un estado de virulencia disminuido estas adhesinas podrían asegurar el anclaje inicial a epitelio. Otro evento primario durante la colonización es la inducción de ciliastosis la cual, junto con el daño al epitelio respiratorio y la acumulación de mucus, dificulta la eliminación del microorganismo. El síntoma característico de la enfermedad es la tos paroxística, la cual parecería ser causada por daño tisular local. Sin embargo, el período de duración de la tos es mayor que el que dura el daño tisular, por lo que probablemente existan otros factores de virulencia, aún no identificados, que contribuyan a la persistencia de los síntomas.

Varios grupos de investigación, incluido el nuestro, mostraron que *B. pertussis* puede invadir y sobrevivir dentro de células del hospedador, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias [78, 80, 181-185], lo que supone un mecanismo de persistencia del microorganismo. Parte del éxito de este patógeno son los múltiples mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedador, mediada principalmente por la acción de CyaA y PT. Específicamente, CyaA ingresa a neutrófilos y provoca la intoxicación de la célula mediante la elevada producción de AMPc, comprometiendo de esta forma su capacidad fagocítica. Por otro lado, PT retarda la migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) al sitio de infección mediante la modulación de producción de citoquinas y quimioquinas en células epiteliales y macrófagos e inhibe la activación de células inmunes [137]. Además de PT, TCT también contribuye a inhibir la quimiotaxis de neutrófilos, al menos in vitro [186]. Como consecuencia de los efectos de CyaA, PT y, tal vez TCT, *B. pertussis* podría evadir la inmunidad innata temprana durante la colonización. El daño tisular local a las células epiteliales ciliadas se adjudica a TCT, a la toxina dermonecrótica (DNT) y en menor medida a CyaA [187]. Por otro lado, tal vez como consecuencia de este conjunto de factores *B. pertussis* evade la interacción innata con neutrófilos y macrófagos [98, 188, 189]. Más aún, de las bacterias que logran fagocitar las células inmunes una proporción importante inhibe su tránsito a lisosomas evitando la acción celular bactericida. En particular, nuestros resultados demostraron que la bacteria es capaz de permanecer viable e incluso replicar dentro de macrófagos [189]. Esto puede significar ventajas sustanciales para la bacteria además de protegerla contra los distintos efectores inmunes. Durante la

respuesta pro-inflamatoria inducida por la infección, un nicho intracelular permitirá que la bacteria se mantenga viva hasta que la reacción inflamatoria sea modulada por los distintos mecanismos anti-inflamatorios, permitiéndole emerger en condiciones de entorno más permisivas. Alternativamente los macrófagos podrían transportar las bacterias a nuevos sitios donde iniciar nuevas microcolonias.

También se ha propuesto que *B. pertussis* es capaz de formar biofilm como modo de persistencia [190, 191]. El biofilm se define como una comunidad de microorganismos sésiles, células que están adheridas a una superficie o unas con otras, embebida en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS) [192] que les confiere resistencia. La capacidad de desarrollar biofilm puede contribuir a la patogénesis y desempeñar un rol importante en la evasión de los mecanismos de inmunidad y en la persistencia a largo plazo dentro del hospedador. Estudios recientes han mostrado evidencia de formaciones de biofilm en la cavidad nasofaríngea en modelos animales [193, 194]

## 1.6 Tratamiento

La infección de niños menores de 6 meses requiere hospitalización debido a las complicaciones que pueden producirse, como por ejemplo, apnea, hipoxia y dificultad para respirar. El tratamiento con antibióticos tiene su máxima efectividad en el periodo de incubación y menos en el catarral. Una vez establecida la tos paroxística, no disminuye significativamente el curso clínico de la enfermedad pero reduce las posibilidades de transmisión a otras personas. En el pasado, la eritromicina era la droga de elección para el tratamiento de pertussis, sin embargo su utilización fue asociada con una serie de efectos adversos entre los que se incluyen hipertrofia pilórica, estenosis en infantes y arritmias cardíacas. Actualmente se recomienda el uso de azitromicina y claritromicina [195]. En niños mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a macrólidos se puede utilizar trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ). Como fármacos coadyuvantes para el tratamiento sintomático de los paroxismos de tos se han empleado el salbutamol, los corticoides y la globulina hiperinmune anti-pertussis [196]. Los dos primeros se emplean con frecuencia tanto en tratamiento ambulatorio como hospitalario. Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios controlados de suficiente amplitud que hayan demostrado su

eficacia. El suero hiperinmune obtenido de adultos en fase de convalecencia de tos convulsa o de adultos vacunados ha sido utilizado en décadas pasadas, sin embargo el beneficio de su uso no ha sido significativo [196], por lo que hasta el momento no está justificado su empleo.

## 1.7 Vacunación

### 1.7.1 Vacunas actuales

Entre 1940 y 1950, se introdujo la primera vacuna contra pertussis, compuesta por células enteras de *B. pertussis* en fase virulenta inactivadas por calor (Pc), formulada en combinación con el toxoide tetánico y diftérico, que se llamó triple bacteriana. Esta vacuna, aunque efectiva en disminuir la incidencia presentaba efectos adversos de distinta magnitud, que iban desde dolor local, fiebre, y encefalopatías hasta causar la muerte en 1 de cada 310000 vacunados. El principal factor desencadenante de estos efectos nocivos es el LPS presente en la bacteria. Estas reacciones adversas desencadenaron una disminución de la aceptación de la vacuna en distintos países e incluso en países tales como Gales, Inglaterra y Japón se detuvo la vacunación contra la tos convulsa. Esto desencadenó una epidemia entre 1977 y 1979 en los tres países mencionados [197, 198] y condujo al desarrollo de nuevas vacunas acelulares (Pa) más seguras, formuladas a partir de ciertos factores de virulencia purificados. La primer vacuna Pa fue desarrollada por Sato y colaboradores [199] en la década de 1970 y estaba formulada con proteínas de *B. pertussis* co-purificadas, que comprendían esencialmente PT y FHA. Posteriormente, se desarrollaron nuevas vacunas compuestas de antígenos purificados individualmente. Las vacunas actualmente en uso son una combinación de FHA, PT, Prn, y Fim, todos factores regulados positivamente por el sistema BvgAS. En la actualidad, la mayoría de los países industrializados utilizan vacunas acelulares, que combinan el toxoide tetánico y diftérico con antígenos purificados de *B. pertussis* (Difteria + Tétano + Pertussis acelular = DTPa). Las diferentes vacunas acelulares contra *B. pertussis* difieren básicamente en el número de antígenos que incluyen. Las monovalentes (solo PT), las bivalentes (PT + FHA), las trivalentes (PT + FHA + Prn) y las pentavalentes (PT + FHA + Prn + Fim2 y Fim3).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en varios países sugieren que, en general, las vacunas con tres o más componentes son más eficaces contra los casos típicos de pertussis o con sintomatología leve que las formulaciones que sólo contienen PT, o PT más FHA [28].

Estudios de evaluación de la eficacia de las distintas vacunas en humanos señalan que las vacunas celulares presentan una mayor protección contra *B. pertussis* que las acelulares. Numerosos estudios indican que la vacuna celular presenta una eficacia próxima al 95% [200-203], mientras que estudios similares de vacunas acelulares arrojaron una mayor variación en los porcentajes de eficacia, con valores que van desde un 59% hasta un 83% de eficacia [200, 203-205]. Resultados similares fueron obtenidos en ensayos de protección en modelos animales [206, 207].

En Argentina, como en la mayoría de los países subdesarrollados, se continua utilizando la vacuna celular que se administra junto con el toxoide tetánico y diftérico (DTPc), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b, formando la vacuna pentavalente (DTPc-HB-Hib). De acuerdo con el Calendario Nacional de Vacunación la misma se aplica en tres dosis que se administran a los 2, 4 y 6 meses de edad. A los 18 meses se administra un primer refuerzo con la vacuna cuádruple bacteriana (DTPc-Hib) de igual composición que la vacuna pentavalente con excepción del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Finalmente, a los 6 años se administra un segundo refuerzo con la vacuna DTPc.

La inmunidad adquirida por vacunación o infección confiere protección solo durante un corto plazo (*waning immunity*) [208]. En el caso de la vacuna celular, la inmunidad comienza a declinar luego de 3 a 5 años, con ausencia de protección demostrable luego de 10 a 12 años [209]. La duración de la protección con la vacuna acelular no ha sido establecida aún, pero aparentemente la inmunidad declinaría luego de 4 a 5 años [27, 209]. Esto determina que la población adulta no se encuentre eficazmente protegida contra la infección en ninguno de los casos.

El objetivo principal de las estrategias de vacunación contra *B. pertussis* es proteger a los infantes y neonatos, en los cuales la enfermedad es severa, pudiendo provocar la

muerte. Debido a que distintos estudios indican que anticuerpos maternos son capaces de conferir protección contra pertussis en el recién nacido [210], la inmunización durante el embarazo puede contribuir a disminuir los casos de tos convulsa en neonatos [211].

Recientemente se ha licenciado en algunos países, entre los que se incluyen Estados Unidos, Australia, Canadá, Francia, Alemania, Suiza, y desde el año 2009 en Argentina, el uso de formulaciones vacunales acelulares para adolescentes y adultos que contienen cantidades menores de toxoide diftérico y de antígeno pertussis (dTPa). Según *The Global Pertussis Initiative*, un grupo de expertos de diferentes países que han formado un Comité de seguimiento epidemiológico de pertussis, la vacunación de adolescentes y adultos no sólo disminuiría la incidencia de la enfermedad sino que reduciría el riesgo de contagio a niños no inmunizados o con esquemas de vacunación incompletos [212]. En nuestro país, se ha incorporado al calendario de vacunación un refuerzo con la vacuna dTPa a los 11 años de edad, a embarazadas a partir de la semana 20 de gestación, a personal de salud que está en contacto con niños menores de 1 año y a familiares de bebés prematuros que pesan menos de 1,5 Kg.

Como se mencionó anteriormente, las vacunas actuales, tanto celulares como acelulares, si bien protegen contra la sintomatología de la enfermedad, no confieren protección contra la colonización, permitiendo que se establezcan infecciones subclínicas y portadores asintomáticos que transmiten la enfermedad a individuos susceptibles. La vacunación regular de adultos está siendo propuesta en muchos países como forma de controlar mejor esta enfermedad. Sin embargo la formulación acelular debe ser mejorada para asegurar el éxito de un plan de vacunación de tales características. Varios grupos están trabajando en esta temática, el nuestro entre ellos, y este trabajo de Tesis se enmarca dentro de este estudio.

### 1.7.2 Estudio de nuevas Vacunas

Los estudios que otros grupos están llevando a cabo para mejorar las formulaciones vacunales se resumen a continuación. Algunos estudios apuntan a la identificación de nuevos antígenos protectores. Un grupo de investigación canadiense ha señalado al

autotransportador BrkA [104] como posible componente de nuevas vacunas. Ensayos en ratones demuestran que, si bien la inmunización con la proteína sola es incapaz de conferir protección contra la infección, BrkA en combinación con FHA y PT mejora la protección conferida por vacunas formuladas con estos dos antígenos [104]. Sin embargo, el agregado de BrkA a la vacuna acelular de tres componentes (FHA, PT y Prn) no mejora su capacidad de protección [104].

Otras estrategias proponen volver a formulaciones celulares modificadas [213-215]. Recientemente se desarrolló una vacuna formulada con una cepa de *B. pertussis* atenuada viva, denominada BPZE1 [215], la cual presenta modificaciones genéticas que eliminan o inactivan tres de las toxinas de *B. pertussis*, PT, TCT y DNT. Esta vacuna, de administración intranasal, está siendo actualmente evaluada en fase 1 de ensayos clínicos en humanos voluntarios. Si bien este tipo de administración presenta ventajas considerables en la inmunización de infantes y los resultados en lo que se refiere a inmunidad conferida son promisorios, existe en la comunidad científica una gran resistencia al uso de este tipo de vacunas, principalmente por la potencialidad de las cepas mutantes de revertir tales mutaciones durante la infección y la imposibilidad de erradicación. Otros estudios proponen emplear vacunas formuladas con bacterias enteras en fase virulenta o vesículas de membrana externa de éstas bacterias que tienen toxicidad disminuida por una mutación en el lípido A del LPS [213]. Cabe señalar que el uso de estas formulaciones en adultos es muy poco probable.

## 1.8 Inmunidad

El desarrollo de inmunidad requiere del reconocimiento de los componentes bacterianos por las células implicadas en la inmunidad innata, la producción de mediadores solubles, y el reclutamiento y activación de moléculas y células efectoras. Cuando *B. pertussis* coloniza la mucosa del tracto respiratorio, se desencadena una respuesta local de citoquinas proinflamatorias [216, 217] que conlleva al reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de la infección. Generalmente, los neutrófilos son las primeras células que llegan, seguidos de una segunda ola compuesta de células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs) y linfocitos [121, 218-221]. Sin embargo, ciertos factores de

virulencia de la bacteria limitan esta respuesta inflamatoria local, retrasando de esta forma su eliminación por las células fagocíticas del huésped. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, las toxinas PT y TCT producidas por *B. pertussis* inhiben el tráfico de células inmunes al tracto respiratorio [137, 186]. Por otro lado, CyaA y FHA inducen la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, que limitan la respuesta local [222-224].

En el tracto respiratorio, *B. pertussis* es eventualmente reconocida y capturada por las DC que procesan y presentan los antígenos bacterianos a las células T, induciendo la generación de una respuesta inmune adaptativa [225]. Tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un rol importante en la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio [225].

La inmunidad celular contra *B. pertussis* está mediada principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> [226, 227]. De acuerdo al perfil de citoquinas que expresan, las células T CD4<sup>+</sup> se dividen en células T *helper* tipo 1 (Th1) y células T *helper* tipo 2 (Th2) [228, 229]. Las células Th1 resultan esenciales en la inmunidad mediada por células y expresan INF- $\gamma$  e IL-12 [230], mientras que las células Th2 juegan un papel más importante en el desarrollo de la respuesta humoral y se caracterizan por la secreción de altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 [230]. Recientemente, se describió otro tipo de células T *helper*, denominadas Th17 [231]. Estas células expresan las citoquinas IL-17, IL-21 e IL-22, y se encuentran implicadas en la respuesta inflamatoria del huésped contra distintos patógenos [232]. En lo que respecta a *B. pertussis*, varios estudios han demostrado un rol importante de las células Th1, secretoras de INF- $\gamma$ , en la protección contra este patógeno [233-235]. También la generación de células Th17 antígeno específicas ha sido recientemente relacionada con la protección contra este patógeno [236, 237]. De esta forma, el reconocimiento de la bacteria por las células presentadoras de antígeno resulta en la inducción de un perfil de citoquinas tipo Th1/Th17 asociado con protección. Sin embargo, mediante distintos factores de virulencia, la bacteria es capaz de estimular la producción de IL-10 [222, 238-241], que inhibe la secreción de INF- $\gamma$ , reduciendo así la eficiencia de la respuesta celular [242].

Estudios recientes señalan la importancia del receptor tipo Toll 4 (*Toll-like receptor*; TLR4) en la inducción de inmunidad innata contra *B. pertussis* [243, 244]. TLR4 reconoce

el LPS presente en bacterias Gram-negativas, incluida *B. pertussis* [244, 245]. Higgins y colaboradores, demostraron que la infección con *B. pertussis* es más severa en ratones deficientes en la expresión de TLR4 y que la señalización vía este receptor induce la producción de IL-10 en DC en respuesta a la infección con *B. pertussis*, lo cual podría inhibir la respuesta inflamatoria y limitar la patología en el aparato respiratorio [244]. Por otra parte, los estudios realizados por otro grupo de investigación indican un patrón de respuesta dependiente de TLR4 diferencial entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* [245]. En la infección con *B. pertussis* los niveles de citoquinas proinflamatorias son menores, lo cual parece estar relacionado con la estructura del LPS de *B. pertussis* y/o la producción de PT [245]. En acuerdo con estas observaciones, recientemente ha sido demostrado que la particular estructura del LPS de *B. pertussis* conduce a una activación menos eficiente de la ruta de señalización del TLR4 [238, 239]. Resultados nuestros apoyan estas observaciones [98]. La interacción innata de *B. pertussis* con neutrófilos no conduce a la activación de la célula inmune por lo que no se desencadena la acción celular bactericida a cargo de estas células, lo cual mejora las chances de sobrevivencia de la bacteria a la interacción.

En cuanto a la inmunidad adquirida por vacunación, el tipo de respuesta generada varía con la vacuna usada. El estudio de la respuesta de células T en infantes inmunizados con vacunas celulares y acelulares sugiere que estas vacunas inducen distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>. La inmunización con vacunas celulares, al igual que lo que sucede durante la infección, induce un perfil de citoquinas predominantemente Th1, mientras que en la inmunización con vacunas acelulares el perfil de citoquinas es tipo del tipo Th1/Th2 [246-249]. Estudios recientes realizados en ratones señalan que la protección conferida por las vacunas celulares involucra la activación de TLR4 y la producción de IL-1, IL-12 e IL-23 por células dendríticas, lo que conduce a la inducción de un perfil tipo Th17 junto con un perfil Th1, mientras que la inmunización con vacunas acelulares induce la producción de IL-5 y anticuerpos IgG1, lo que determina un perfil tipo Th2 [236].

En relación a la inmunidad humoral, distintos estudios demuestran que la presencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* cumple un rol fundamental en la protección contra esta infección [250, 251]. Anticuerpos contra determinados antígenos de *B. pertussis* pueden prevenir la adhesión a células epiteliales del tracto respiratorio (bloqueo de adhesinas),



neutralizar toxinas bacterianas, o promover la opsonofagocitosis. Ha sido demostrado que anticuerpos dirigidos contra PT son capaces de conferir protección contra la infección [92]. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que la opsonización por anticuerpos específicos es crucial para inducir la actividad celular bactericida contra este patógeno [97]. En ausencia de anticuerpos opsonizantes, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir, e incluso replicar, dentro del huésped [188, 189]. Un aspecto particularmente interesante de estos estudio es que de los antígenos incluidos en las vacunas acelulares, Prn, uno de los antígenos que presenta variaciones en zonas inmunodominantes en las cepas circulantes respecto de la cepa vacunal [252], es el único que induce anticuerpos con actividad opsonofagocítica [97], lo cual parece apoyar la hipótesis de variación antigénica en las cepas circulantes dirigida por vacunación. En este mismo sentido, recientemente fueron identificados aislados clínicos defectivos en la expresión de Prn [30-32]. Nuestro grupo también demostró que la capacidad de anticuerpos dirigidos contra Fim de inducir la aglutinación bacteriana conduce a una disminución de adhesión de la bacteria a células epiteliales [253], señalando la importancia de la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas.

En resumen, una respuesta protectora contra *B. pertussis* requiere tanto de inmunidad humoral como celular. Los distintos factores de virulencia de *B. pertussis* y su capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador explican la necesidad de anticuerpos bloqueantes de la adhesión, neutralizantes de toxinas o capaces de promover la fagocitosis de la bacteria. Por otro lado, resultados de nuestro grupo que señalan la capacidad de esta bacteria de invadir y duplicar dentro de macrófagos, sugieren la existencia de una posible fase intracelular durante la infección, lo que resalta la necesidad de la inducción de inmunidad mediada por células en la protección contra *B. pertussis*. Esto podría explicar la menor protección conferida por las vacunas acelulares, inductoras de respuesta humoral principalmente.



## 1.9 Antecedentes y objetivos de este trabajo

La tos convulsa es una enfermedad inmunoprevenible causada por la bacteria Gram negativa *B. pertussis*, que no ha podido erradicarse a pesar de la vacunación masiva. Datos epidemiológicos ponen de manifiesto la necesidad de mejorar las vacunas actuales. Si bien tanto la infección natural como la inmunización confieren cierto grado de protección contra los síntomas de la enfermedad, no previenen eficazmente la colonización del epitelio por *B. pertussis* [28, 225], permitiendo la circulación de la bacteria en la población. Actualmente se postula que la falta de protección contra la colonización de las vacunas en uso podría deberse fundamentalmente a que la bacteria infectante tiene características fenotípicas tales que determinan que los anticuerpos inducidos por vacunación con bacterias únicamente en fase virulenta, o antígenos purificados característicos de esta fase, no son capaces de detener los estadios iniciales de colonización. Apoyando esta hipótesis existen estudios que sugieren que *B. pertussis* se transmite en fase avirulenta o intermedia [34]. A estas posibles diferencias fenotípicas, se suma la aparición de cepas circulantes que presentan variantes polimórficas en zonas inmunodominantes de antígenos incluidos en las vacunas [29] o, peor aún, cepas que carecen de la expresión de algunos de estos antígenos [30-32]. Así, los anticuerpos generados por vacunación podrían no reconocer, o reconocer débilmente el fenotipo infectante lo que puede conferir a la bacteria la posibilidad de sobrevivir dentro del hospedador transitoriamente o en períodos prolongados. Los distintos estudios que se están llevando a cabo para mejorar las formulaciones vacunales se basan en la búsqueda de nuevos antígenos expresados en fase virulenta o nuevas vacunas celulares formuladas con bacterias atenuadas también en fase virulenta. Nuestra estrategia de mejora de la formulación se basó en la búsqueda de inmunógenos expresados por la bacteria en condiciones de entorno dentro del hospedador independientemente de la fase de virulencia inducida en el fenotipo infectante.

La naturaleza del nutriente que limita el crecimiento bacteriano influye en la magnitud y el tipo de cambios fenotípicos que presenta un microorganismo. En particular, el hierro es uno de los nutrientes que conduce a cambios tales que las bacterias presentan marcadas diferencias fenotípicas con respecto a limitaciones en otros nutrientes, lo cual

generalmente conduce a cambios importantes en la estructura antigénica de la bacteria. La adquisición de hierro es un factor determinante para la sobrevivencia de un patógeno dentro de su hospedador. Bajo limitación de hierro *B. pertussis* expresa un conjunto de sistemas de captura de hierro de alta afinidad, incluyendo un receptor del grupo hemo [157] y distintas proteínas de membrana externa, como son receptores de sideróforos y de xenosideróforos propios y ajenos [166, 254], y otras proteínas de función desconocidas [176, 254]. Previamente ha sido demostrada la importancia de la expresión del sideróforo alcalignina [255] y del sistema de utilización de hemoproteínas [256] *in vivo*, lo que sugiere que la bacteria se encuentra limitada en hierro durante la infección. Estudios realizados por Pradel y col. y Brickman y col [170, 179, 256] también sustentan esta hipótesis. En este mismo sentido, la presencia de anticuerpos dirigidos contra proteínas cuya expresión es inducida por la baja disponibilidad de hierro demostrada por nuestro grupo [176] sustenta la hipótesis de que *B. pertussis* se encuentra limitada en hierro dentro del hospedador. Debido a que *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano y, por lo tanto, la transmisión se produce de hospedador a hospedador, es probable que el fenotipo infectante presente las características encontradas en la bacteria adaptada al estrés nutricional por limitación en hierro. De esta forma, el estudio del fenotipo expresado por la bacteria bajo limitación de hierro puede abrir nuevas posibilidades a la búsqueda de mejores formulaciones vacunales. Los datos que se presentan en este trabajo intentan avanzar en la caracterización del fenotipo de *B. pertussis* limitado en hierro, su relación con el hospedador, y la evaluación de inmunógenos protectores expresados por este fenotipo como posibles componentes de vacunas de nueva generación.

A modo de resumen, en el **Capítulo 2** se describe la metodología general empleada en este trabajo de Tesis. En el **Capítulo 3** se describen los estudios orientados a avanzar en la caracterización del proteoma de *B. pertussis* y la composición macromolecular de la bacteria cultivada bajo limitación de hierro, previamente iniciada por nuestro grupo [176]. Los resultados de estos estudios indican que la bacteria cultivada en estas condiciones, no sólo expresa un conjunto de sistemas de captura de hierro, y proteínas involucradas en distintas rutas metabólicas, propias de la limitación, sino que además presenta una atenuación de la virulencia y la posible formación de cápsula, algo muy discutido en el caso de *Bordetella*. En este Capítulo también se describen los ensayos realizados para evaluar el

efecto de la adaptación de *B. pertussis* a la limitación de hierro en su interacción con células del sistema inmune del huésped. Estos estudios muestran que dicha adaptación induce factores que determinan la menor adhesión y fagocitosis de este fenotipo por neutrófilos, lo que sugiere que la adaptación a las condiciones de entorno *in vivo* podría favorecer la evasión de la respuesta innata del huésped. En el **Capítulo 4** se describe el estudio de tres proteínas expresadas por la bacteria bajo limitación de hierro previamente identificadas por inmunoproteómica [176] como posibles nuevos antígenos vacunales. Dos de ellas fueron identificadas en el subproteoma de membrana externa y podrían ser proteínas claves en la adquisición de hierro *in vivo*. La tercera es una lipoproteína, y como tal podría ser capaz de actuar como adyuvante estimulando el sistema inmune del hospedador, característica compartida con muchas lipoproteínas bacterianas. Los resultados indican que los tres antígenos reúnen las características necesarias para ser evaluados en formulaciones vacunales, como son la elevada antigenicidad, exposición en la superficie bacteriana (en el caso de aquellas proteínas identificadas en el subproteoma de membrana externa [176]), conservación entre cepas circulantes y expresión durante la infección. En el **Capítulo 5** se describen los ensayos realizados para evaluar la capacidad protectora de las tres proteínas. Los resultados indican que las dos proteínas unidoras de hierro no sólo confieren protección en formulaciones monovalentes, sino que además son capaces de aumentar la protección conferida por la vacuna acelular lo cual las señala como potenciales componentes de nuevas vacunas. En lo que se refiere a Lip, si bien presenta capacidades adyuvantes, no presentó capacidad protectora en formulaciones monovalentes, si presentó capacidad adyuvante. En el **Capítulo 6** se presenta la Discusión General de este trabajo.



## Referencias

- [1] Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci* 2001 Nov 1;6:E168-86.
- [2] Cone TC, Jr. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics* 1970 Oct;46(4):522.
- [3] Bordet J, O G. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1906;20:48-68.
- [4] WD L. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Revista chilena de infectología* 2004;21:241-6.
- [5] Andrews R, Herceg A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia, 1991 to 1997. *Commun Dis Intell* 1997 May 29;21(11):145-8.
- [6] Baron S, Njamkepo E, Grimprel E, Begue P, Desenclos JC, Drucker J, et al. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 1998 May;17(5):412-8.
- [7] de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JF. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 1997 Apr-Jun;3(2):175-8.
- [8] Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, et al. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* 1999 Jun;28(6):1230-7.
- [9] Gzyl A, Augustynowicz E, Rabczenko D, Gniadek G, Slusarczyk J. Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol* 2004 Apr;33(2):358-65.
- [10] He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008 Jun;3(3):329-39.
- [11] Hellenbrand W, Beier D, Jensen E, Littmann M, Meyer C, Oppermann H, et al. The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect Dis* 2009;9:22.
- [12] Ntezayabo B, De Serres G, Duval B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* 2003 Jan;22(1):22-7.
- [13] Van Buynder PG, Owen D, Vurdien JE, Andrews NJ, Matthews RC, Miller E. *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales: 1995-7. *Epidemiol Infect* 1999 Dec;123(3):403-11.
- [14] De Serres G, Duval B. Pertussis vaccination beyond childhood. *Lancet* 2005 Mar 19-25;365(9464):1015-6.
- [15] Hewlett EL, Edwards KM. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* 2005 Mar 24;352(12):1215-22.

- [16] Celentano LP, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi AE. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2005 Sep;24(9):761-5.
- [17] Pertussis--United States, 2001-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005 Dec 23;54(50):1283-6.
- [18] Cherry JD. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis* 1999 Jun;28 Suppl 2:S112-7.
- [19] Wheeler JG, Simmons AL. Pertussis update. *Pediatr Infect Dis J* 2005 Sep;24(9):829-30.
- [20] Edwards K, Freeman DM. Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention. *Curr Opin Pediatr* 2006 Feb;18(1):77-80.
- [21] De Serres G, Shadmani R, Duval B, Boulianne N, Dery P, Douville Fradet M, et al. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis* 2000 Jul;182(1):174-9.
- [22] Kowalzik F, Barbosa AP, Fernandes VR, Carvalho PR, Avila-Aguero ML, Goh DY, et al. Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J* 2007 Mar;26(3):238-42.
- [23] Senanayake S. Pertussis in Australia today - a disease of adolescents and adults that can kill infants. *Aust Fam Physician* 2007 Jan-Feb;36(1-2):51-6.
- [24] Tan T, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2005 May;24(5 Suppl):S10-8.
- [25] von Konig CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2002 Dec;2(12):744-50.
- [26] Fine PE, Clarkson JA. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. *Lancet* 1982 Mar 20;1(8273):666-9.
- [27] Yeh SH, Mink CM. Shift in the epidemiology of pertussis infection: an indication for pertussis vaccine boosters for adults? *Drugs* 2006;66(6):731-41.
- [28] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):326-82.
- [29] Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2009;10(1):36-49.
- [30] Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 2009;27(43):6034-41. Epub 2009 Aug 8.
- [31] Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* 2012;7(2):e31985.



- [32] Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* 2012 Aug 22.
- [33] McCabe K, Turner J, Hernandez M, Merkel T. Regulation and function of the *Bordetella pertussis* aerosol tolerance genes. 9th International *Bordetella* Symposium 2010.
- [34] Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, Martinez de Tejada G. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* 2005;73(2):748-60.
- [35] Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, et al. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 2009 Oct;59(4):225-31.
- [36] Fingerhann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, Bottero D, et al. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 2006 Apr 24;24(17):3513-21.
- [37] Cotter P, Miller J, Groisman E. *Bordetella* Principles of bacterial pathogenesis. London, United Kingdom: Academic Press, Ltd 2001:619-74.
- [38] Long SS, Lischner HW, Deforest A, Clark JL. Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children. *Pediatr Infect Dis J* 1990 Oct;9(10):700-5.
- [39] Long SS, Welkon CJ, Clark JL. Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis* 1990 Mar;161(3):480-6.
- [40] Cherry JD, Grimpel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J* 2005 May;24(5 Suppl):S25-34.
- [41] Heininger U, Cherry JD, Eckhardt T, Lorenz C, Christenson P, Stehr K. Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 1993 Jun;12(6):504-9.
- [42] Heininger U, Klich K, Stehr K, Cherry JD. Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics* 1997 Dec;100(6):E10.
- [43] Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J* 2004 Nov;23(11):985-9.
- [44] Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, Birmingham M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* 2003 Jul;3(7):413-8.
- [45] Deen JL, Mink CA, Cherry JD, Christenson PD, Pineda EF, Lewis K, et al. Household contact study of *Bordetella pertussis* infections. *Clin Infect Dis* 1995 Nov;21(5):1211-9.

- [46] Beiter A, Lewis K, Pineda EF, Cherry JD. Unrecognized maternal peripartum pertussis with subsequent fatal neonatal pertussis. *Obstet Gynecol* 1993 Oct;82(4 Pt 2 Suppl):691-3.
- [47] Christie CD, Baltimore RS. Pertussis in neonates. *Am J Dis Child* 1989 Oct;143(10):1199-202.
- [48] Hoppe JE. Neonatal pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2000 Mar;19(3):244-7.
- [49] McGregor J, Ogle JW, Curry-Kane G. Perinatal pertussis. *Obstet Gynecol* 1986 Oct;68(4):582-6.
- [50] Mikelova LK, Halperin SA, Scheifele D, Smith B, Ford-Jones E, Vaudry W, et al. Predictors of death in infants hospitalized with pertussis: a case-control study of 16 pertussis deaths in Canada. *J Pediatr* 2003 Nov;143(5):576-81.
- [51] Cotter PA, DiRita VJ. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:519-65.
- [52] Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* 2003 Aug;11(8):367-73.
- [53] Stibitz S, Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1991 Jul;173(14):4288-96.
- [54] Boucher PE, Stibitz S. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1995 Nov;177(22):6486-91.
- [55] Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* 2001;40(3):669-83.
- [56] Cotter PA, Miller JF. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol* 1997 May;24(4):671-85.
- [57] Melton AR, Weiss AA. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993;61(3):807-15.
- [58] Merkel TJ, Barros C, Stibitz S. Characterization of the bvgR locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1998 Apr;180(7):1682-90.
- [59] Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 2003 Dec;185(23):6902-12.
- [60] Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 1991 Dec;10(12):3971-5.
- [61] Veal-Carr WL, Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* 2005;55(3):788-98.

- [62] Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* 2006 Mar;188(5):1775-85.
- [63] Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, Carbonetti NH. Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1999 Sep;181(17):5234-41.
- [64] Roy CR, Miller JF, Falkow S. Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* bvgABC operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 May;87(10):3763-7.
- [65] Sukumar N, Mishra M, Sloan GP, Ogi T, Deora R. Differential Bvg phase-dependent regulation and combinatorial role in pathogenesis of two *Bordetella* paralogs, BipA and BcfA. *J Bacteriol* 2007 May;189(10):3695-704.
- [66] Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 2001 Jan;39(1):65-78.
- [67] Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun* 1998 Oct;66(10):4640-50.
- [68] Stenson TH, Allen AG, Al-Meer JA, Maskell D, Peppler MS. *Bordetella pertussis* risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun* 2005 Sep;73(9):5995-6004.
- [69] Croinin TO, Grippe VK, Merkel TJ. Activation of the vrg6 promoter of *Bordetella pertussis* by RisA. *J Bacteriol* 2005 Mar;187(5):1648-58.
- [70] Mazar J, Cotter PA. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* 2006 Nov;62(3):641-54.
- [71] Boucher PE, Yang MS, Schmidt DM, Stibitz S. Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the fha promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 2001 Jan;183(2):536-44.
- [72] Roy CR, Falkow S. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the fhaB gene and autoregulation of the bvgAS operon. *J Bacteriol* 1991 Apr;173(7):2385-92.
- [73] Guedin S, Willery E, Tommassen J, Fort E, Drobecq H, Loch C, et al. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 2000 Sep 29;275(39):30202-10.
- [74] Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, Molle G, et al. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 1999 Dec 31;274(53):37731-5.

- [75] Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Locht C, Jacob-Dubuisson F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* 2006 Jul;61(2):368-82.
- [76] Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 2001 Sep 17;20(18):5040-8.
- [77] Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* 1990 Jun 29;61(7):1375-82.
- [78] Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* 1991;173(5):1143-9.
- [79] Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 1994 Oct 1;180(4):1225-33.
- [80] Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog* 2001 May;30(5):279-88.
- [81] Ishibashi Y, Nishikawa A. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb Pathog* 2002 Sep;33(3):115-25.
- [82] Ishibashi Y, Nishikawa A. Role of nuclear factor-kappa B in the regulation of intercellular adhesion molecule 1 after infection of human bronchial epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 2003 Oct;35(4):169-77.
- [83] Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993 Jul;61(7):2780-5.
- [84] Menozzi FD, Gantiez C, Locht C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 1991 Feb;62(1):59-64.
- [85] Perez Vidakovics ML, Lamberti Y, van der Pol WL, Yantorno O, Rodriguez ME. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48(1):140-7.
- [86] Mooi FR, van der Heide HG, ter Avest AR, Welinder KG, Livey I, van der Zeijst BA, et al. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog* 1987 Jun;2(6):473-84.
- [87] Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, Renauld G, Bertin P, van den Akker WM, et al. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster:

identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol* 1994 Jan;11(2):337-47.

[88] Hazenbos WL, Geuijen CA, van den Berg BM, Mooi FR, van Furth R. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis* 1995 Apr;171(4):924-9.

[89] Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC, et al. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* 1992 Feb;12(2):127-35.

[90] Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* 1997 Oct;65(10):4222-8.

[91] Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1995 Oct 15;155(8):3972-8.

[92] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16(20):1907-16.

[93] Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16(20):1901-6.

[94] Rodriguez ME, Hellwig SM, Perez Vidakovics ML, Berbers GA, van de Winkel JG. *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46(1):39-47.

[95] Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001 Mar;69(3):1231-43.

[96] Emsley P, McDermott G, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* 1994 Jan 14;235(2):772-3.

[97] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003;188(5):738-42. Epub 2003 Aug 5.

[98] Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 2001;167(11):6545-51.

[99] Cherry JD. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J* 1997 Apr;16(4 Suppl):S90-6.

[100] Finn TM, Stevens LA. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* 1995 May;16(4):625-34.

[101] Fernandez RC, Weiss AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 1994 Nov;62(11):4727-38.

- [102] Finn TM, Amsbaugh DF. Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* 1998 Aug;66(8):3985-9.
- [103] Barnes MG, Weiss AA. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 2001 May;69(5):3067-72.
- [104] Marr N, Oliver DC, Laurent V, Poolman J, Denoel P, Fernandez RC. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* 2008;26(34):4306-11. Epub 2008 Jun 26.
- [105] Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 1995 Nov 3;270(44):26370-6.
- [106] Welch RA. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 1991 Mar;5(3):521-8.
- [107] Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 1988 Dec 1;7(12):3997-4004.
- [108] Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, Gray MC. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem* 1989 Nov 15;264(32):19379-84.
- [109] Rogel A, Meller R, Hanski E. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem* 1991 Feb 15;266(5):3154-61.
- [110] Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, Coote JG, Parton R, Hanski E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *EMBO J* 1989 Sep;8(9):2755-60.
- [111] Zaretzky FR, Gray MC, Hewlett EL. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol* 2002 Sep;45(6):1589-98.
- [112] El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, et al. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* 2003 Oct 3;278(40):38514-21.
- [113] Guermonprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, et al. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2001 May 7;193(9):1035-44.
- [114] Wolff J, Cook GH, Goldhammer AR, Berkowitz SA. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 Jul;77(7):3841-4.
- [115] Confer DL, Slungaard AS, Graf E, Panter SS, Eaton JW. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: entry of bacterial adenylate cyclase into mammalian cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1984;17:183-7.

- [116] Hanski E. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. Trends Biochem Sci 1989 Nov;14(11):459-63.
- [117] Hanski E, Farfel Z. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. J Biol Chem 1985 May 10;260(9):5526-32.
- [118] Moullem M, Farfel Z, Hanski E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. Infect Immun 1990 Nov;58(11):3759-64.
- [119] Gray MC, Donato GM, Jones FR, Kim T, Hewlett EL. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. Mol Microbiol 2004 Sep;53(6):1709-19.
- [120] Confer DL, Eaton JW. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. Science 1982 Sep 3;217(4563):948-50.
- [121] Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun 1993 Oct;61(10):4064-71.
- [122] Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. Pediatr Infect Dis 1984 Sep-Oct;3(5):467-86.
- [123] Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1979 Sep;25(3):896-901.
- [124] Zhang YL, Sekura RD. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1991 Oct;59(10):3754-9.
- [125] Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, Kashimoto T, Takao T, Shimonishi Y, et al. Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. EMBO J 2000 Feb 15;19(4):521-30.
- [126] Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K. Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. J Biol Chem 1999 Nov 5;274(45):31875-81.
- [127] Fukui A, Horiguchi Y. *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. J Biochem 2004 Oct;136(4):415-9.
- [128] Matsuzawa T, Fukui A, Kashimoto T, Nagao K, Oka K, Miyake M, et al. *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. J Biol Chem 2004 Jan 23;279(4):2866-72.
- [129] Locht C, Keith JM. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. Science 1986 Jun 6;232(4755):1258-64.
- [130] Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Casagli MC, Borri MG, Antoni G, et al. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. Proc Natl Acad Sci U S A 1986 Jul;83(13):4631-5.

- [131] Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 1982 Oct 26;21(22):5516-22.
- [132] Farizo KM, Cafarella TG, Burns DL. Evidence for a ninth gene, ptII, in the locus encoding the pertussis toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PtlI-PtlF complex. *J Biol Chem* 1996 Dec 6;271(49):31643-9.
- [133] Verma A, Burns DL. Requirements for assembly of PtlH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2007 May;75(5):2297-306.
- [134] Kaslow HR, Burns DL. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* 1992 Jun;6(9):2684-90.
- [135] Katada T, Tamura M, Ui M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys* 1983 Jul 1;224(1):290-8.
- [136] Carbonetti NH, Artamonova GV, Van Rooijen N, Ayala VI. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 2007 Apr;75(4):1713-20.
- [137] Kirimanjeswara GS, Agosto LM, Kennett MJ, Bjornstad ON, Harvill ET. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest* 2005;115(12):3594-601. Epub 2005 Nov 17.
- [138] Shumilla JA, Lacaille V, Hornell TM, Huang J, Narasimhan S, Relman DA, et al. *Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression. *Infect Immun* 2004 Mar;72(3):1450-62.
- [139] van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI. Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun* 1992 Aug;60(8):3303-8.
- [140] Martino A, Volpe E, Auricchio G, Colizzi V, Baldini PM. Influence of pertussis toxin on CD1a isoform expression in human dendritic cells. *J Clin Immunol* 2006 Mar;26(2):153-9.
- [141] Cookson BT, Tyler AN, Goldman WE. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* 1989 Feb 21;28(4):1744-9.
- [142] Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, Goldman WE, Folkenning WJ. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun* 1987 Sep;55(9):2117-20.
- [143] Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, et al. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect Immun* 1991 Jan;59(1):337-45.
- [144] Flak TA, Goldman WE. Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Oct;154(4 Pt 2):S202-6.



- [145] Preston A, Thomas R, Maskell DJ. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog* 2002 Sep;33(3):91-5.
- [146] Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, et al. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun* 1980 Mar;27(3):739-45.
- [147] Nakase Y, Tateishi M, Sekiya K, Kasuga T. Chemical and biological properties of the purified O antigen of *Bordetella pertussis*. *Jpn J Microbiol* 1970 Jan;14(1):1-8.
- [148] Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol* 1990 Mar;136(3):489-93.
- [149] Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol* 2004 Aug 1;173(3):1959-65.
- [150] Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* 1999 Jul;1(1):51-60.
- [151] Bullen JJ. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981 Nov-Dec;3(6):1127-38.
- [152] Genco CA, Dixon DW. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* 2001 Jan;39(1):1-11.
- [153] Mietzner TA, Morse SA. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu Rev Nutr* 1994;14:471-93.
- [154] Wandersman C, Stojiljkovic I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* 2000 Apr;3(2):215-20.
- [155] Schryvers AB, Stojiljkovic I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1999;32(6):1117-23.
- [156] Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 1995 Nov 10;270(45):26723-6.
- [157] Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* bhu locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol* 2001;183(14):4278-87.
- [158] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988 Apr 29;240(4852):640-2.
- [159] Brickman TJ, Anderson MT, Armstrong SK. *Bordetella* iron transport and virulence. *Biometals* 2007;20(3-4):303-22. Epub 2007 Feb 13.
- [160] Beall BW, Sanden GN. Cloning and initial characterization of the *Bordetella pertussis* fur gene. *Curr Microbiol* 1995 Apr;30(4):223-6.
- [161] Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1995;177(4):1116-8.

- [162] Beaumont FC, Kang HY, Brickman TJ, Armstrong SK. Identification and characterization of *alcR*, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1998;180(4):862-70.
- [163] Brickman TJ, Kang HY, Armstrong SK. Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the *AlcR* regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol* 2001;183(2):483-9.
- [164] Pradel E, Guiso N, Locht C. Identification of *AlcR*, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1998 Feb;180(4):871-80.
- [165] Brickman TJ, Armstrong SK. *Bordetella* *AlcS* transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J Bacteriol* 2005 Jun;187(11):3650-61.
- [166] Brickman TJ, Armstrong SK. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor *FauA* in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol* 1999;181(19):5958-66.
- [167] Kang HY, Armstrong SK. Transcriptional analysis of the *Bordetella* alcaligin siderophore biosynthesis operon. *J Bacteriol* 1998 Feb;180(4):855-61.
- [168] Brickman TJ, Kang HY, Armstrong SK. Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the *AlcR* regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol* 2001 Jan;183(2):483-9.
- [169] Moeck GS, Coulton JW. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* 1998;28(4):675-81.
- [170] Pradel E, Guiso N, Menozzi FD, Locht C. *Bordetella pertussis* *TonB*, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* 2000;68(4):1919-27.
- [171] Beall B, Sanden GN. A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology* 1995 Dec;141 ( Pt 12):3193-205.
- [172] Anderson MT, Armstrong SK. The *BfeR* regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella* enterobactin utilization genes. *J Bacteriol* 2004 Nov;186(21):7302-11.
- [173] Nicholson ML, Beall B. Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology* 1999;145(Pt 9):2453-61.
- [174] Vanderpool CK, Armstrong SK. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol* 2004 Feb;186(4):938-48.
- [175] Wyckoff EE, Lopreato GF, Tipton KA, Payne SM. *Shigella dysenteriae* *ShuS* promotes utilization of heme as an iron source and protects against heme toxicity. *J Bacteriol* 2005 Aug;187(16):5658-64.

- [176] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [177] Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol* 2011 Jul 8.
- [178] Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol* 2012 Aug 24.
- [179] Brickman TJ, Hanawa T, Anderson MT, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol* 2008;70(1):3-14. Epub 2008 Jun 28.
- [180] Vidakovics ML, Lamberti Y, Serra D, Berbers GA, van der Pol WL, Rodriguez ME. Iron stress increases *Bordetella pertussis* mucin-binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51(2):414-21. Epub 2007 Aug 29.
- [181] Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2000 Apr;68(4):1934-41.
- [182] Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, et al. Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 1996 Nov;142 ( Pt 11):3261-8.
- [183] Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 1992 Nov;60(11):4578-85.
- [184] Hazenbos WL, van den Berg BM, van't Wout JW, Mooi FR, van Furth R. Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized *Bordetella pertussis* by human monocytes. *Infect Immun* 1994 Nov;62(11):4818-24.
- [185] Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999 Dec;26(3-4):203-7.
- [186] Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, Goldman WE, Flak T, Cole PJ, et al. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun* 1994 Feb;62(2):639-43.
- [187] Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* 1995 May;16(4):733-43.

- [188] Lamberti Y, Perez Vidakovich ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* 2008;44(6):501-11. Epub 2008 Jan 9.
- [189] Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovich ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 2010 Mar;78(3):907-13.
- [190] Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006 Aug;71(5):736-47.
- [191] Serra D, Bosch A, Russo DM, Rodriguez ME, Zorreguieta A, Schmitt J, et al. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem* 2007 Mar;387(5):1759-67.
- [192] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):167-93.
- [193] Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010 Sep;77(6):1439-55.
- [194] Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 2011;6(12):e28811.
- [195] Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev* 2007(3):CD004404.
- [196] González-Hachero J. Diagnóstico y tratamiento de la tos ferina. *Vox Paediatrica* 1999;7:135-8.
- [197] Miller CL, Fletcher WB. Severity of notified whooping cough. *Br Med J* 1976 Jan 17;1(6002):117-9.
- [198] Watanabe M, Nagai M. Acellular pertussis vaccines in Japan: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 2005 Apr;4(2):173-84.
- [199] Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 1999;27(2):61-9.
- [200] Liese JG, Meschievitz CK, Harzer E, Froeschle J, Hosbach P, Hoppe JE, et al. Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997 Nov;16(11):1038-44.
- [201] Schmitt HJ, von König CH, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H, et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996 Jan 3;275(1):37-41.

- [202] Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Itean I, et al. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* 1997 Oct;15(15):1606-12.
- [203] Stehr K, Cherry JD, Heininger U, Schmitt-Grohe S, uberall M, Laussucq S, et al. A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. *Pediatrics* 1998 Jan;101(1 Pt 1):1-11.
- [204] Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 1996 Feb 8;334(6):349-55.
- [205] Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Lind L, Sundh V, Zackrisson G, et al. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med* 1995 Oct 19;333(16):1045-50.
- [206] Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1998;66(2):594-602.
- [207] van den Berg BM, David S, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R. Protection and humoral immune responses against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular or cellular pertussis immunogens. *Vaccine* 2000;19(9-10):1118-28.
- [208] Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2005 May;24(5 Suppl):S58-61.
- [209] Halperin SA. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med* 2007 Jan 11;356(2):110-3.
- [210] Van Rie A, Wendelboe AM, Englund JA. Role of maternal pertussis antibodies in infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005 May;24(5 Suppl):S62-5.
- [211] Mooi FR, de Greeff SC. The case for maternal vaccination against pertussis. *Lancet Infect Dis* 2007 Sep;7(9):614-24.
- [212] Forsyth KD, Campins-Marti M, Caro J, Cherry JD, Greenberg D, Guiso N, et al. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative. *Clin Infect Dis* 2004 Dec 15;39(12):1802-9.
- [213] Dias WO, van der Ark AA, Sakauchi MA, Kubrusly FS, Prestes AF, Borges MM, et al. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum Vaccin Immunother* 2013 Jan 4;9(2).
- [214] Sukumar N, Sloan GP, Conover MS, Love CF, Mattoo S, Kock ND, et al. Cross-species protection mediated by a *Bordetella bronchiseptica* strain lacking antigenic homologs present in acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 2010 May;78(5):2008-16.

- [215] Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Quatannens J, Engle J, Goldman WE, et al. Attenuated *Bordetella pertussis*: new live vaccines for intranasal immunisation. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-54-5.
- [216] Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingeras TR, McNamara N, Lemjabbar H, et al. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Dec 5;97(25):13847-52.
- [217] Bassinet L, Fitting C, Housset B, Cavaillon JM, Guiso N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2004 Sep;72(9):5530-3.
- [218] Byrne P, McGuirk P, Todryk S, Mills KH. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2004 Sep;34(9):2579-88.
- [219] McGuirk P, Mahon BP, Griffin F, Mills KH. Compartmentalization of T cell responses following respiratory infection with *Bordetella pertussis*: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28. *Eur J Immunol* 1998 Jan;28(1):153-63.
- [220] McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, et al. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med* 1996 Dec 1;184(6):2429-32.
- [221] Vandebriel RJ, Hellwig SM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, et al. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog* 2003 Jul;35(1):19-29.
- [222] Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH, Boyd AP. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun* 2004;72(3):1568-79.
- [223] Boschwitz JS, Batanghari JW, Kedem H, Relman DA. *Bordetella pertussis* infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation. *J Infect Dis* 1997 Sep;176(3):678-86.
- [224] Hickey FB, Brereton CF, Mills KH. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2008 Jul;84(1):234-43.
- [225] Mills KH. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 2001;3(8):655-77.
- [226] Mills KH, Barnard A, Watkins J, Redhead K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun* 1993;61(2):399-410.

- [227] Leef M, Elkins KL, Barbic J, Shahin RD. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production. *J Exp Med* 2000;191(11):1841-52.
- [228] Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2002 Jan;2(1):55-60.
- [229] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
- [230] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- [231] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005 Nov;6(11):1133-41.
- [232] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008 Apr;28(4):454-67.
- [233] Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *J Exp Med* 1997;186(11):1843-51.
- [234] Peppoloni S, Nencioni L, Di Tommaso A, Tagliabue A, Parronchi P, Romagnani S, et al. Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1991;59(10):3768-73.
- [235] Barbic J, Leef MF, Burns DL, Shahin RD. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 1997;65(12):4904-8.
- [236] Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 2006 Dec 1;177(11):7980-9.
- [237] Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, et al. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 2010 Aug 1;185(3):1711-9.
- [238] Fedele G, Celestino I, Spensieri F, Frasca L, Nasso M, Watanabe M, et al. Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response. *Microbes Infect* 2007 Jun;9(7):855-63.
- [239] Fedele G, Nasso M, Spensieri F, Palazzo R, Frasca L, Watanabe M, et al. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. *J Immunol* 2008 Jul 1;181(1):208-16.
- [240] McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 2002 Jan 21;195(2):221-31.

- [241] Nagamatsu K, Kuwae A, Konaka T, Nagai S, Yoshida S, Eguchi M, et al. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med* 2009 Dec 21;206(13):3073-88.
- [242] Dirix V, Verscheure V, Goetghebuer T, Hainaut M, Debie AS, Locht C, et al. Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*- specific gamma interferon response in vaccinated infants. *Clin Vaccine Immunol* 2009 Dec;16(12):1816-21.
- [243] Banus HA, Vandebriel RJ, de Ruiter H, Dormans JA, Nagelkerke NJ, Mooi FR, et al. Host genetics of *Bordetella pertussis* infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. *Infect Immun* 2006 May;74(5):2596-605.
- [244] Higgins SC, Lavelle EC, McCann C, Keogh B, McNeela E, Byrne P, et al. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol* 2003 Sep 15;171(6):3119-27.
- [245] Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, Harvill ET. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun* 2005 Dec;73(12):8144-52.
- [246] Dirix V, Verscheure V, Goetghebuer T, Hainaut M, Debie AS, Locht C, et al. Cytokine and antibody profiles in 1-year-old children vaccinated with either acellular or whole-cell pertussis vaccine during infancy. *Vaccine* 2009 Oct 9;27(43):6042-7.
- [247] Ryan M, Gothefors L, Storsaeter J, Mills KH. *Bordetella pertussis*-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Dev Biol Stand* 1997;89:297-305.
- [248] Ryan M, Murphy G, Ryan E, Nilsson L, Shackley F, Gothefors L, et al. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* 1998 Jan;93(1):1-10.
- [249] Ausiello CM, Urbani F, la Sala A, Lande R, Cassone A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 1997;65(6):2168-74.
- [250] Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998 Dec;16(20):1901-6.
- [251] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998 Dec;16(20):1907-16.
- [252] Boursaux-Eude C, Guiso N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 2000 Aug;68(8):4815-7.
- [253] Rodriguez ME, Hellwig SM, Perez Vidakovics ML, Berbers GA, van de Winkel JG. *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006 Feb;46(1):39-47.



- [254] Agiato LA, Dyer DW. Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect Immun* 1992;60(1):117-23.
- [255] Brickman TJ, Armstrong SK. Impact of alcaligin siderophore utilization on in vivo growth of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2007;75(11):5305-12. Epub 2007 Aug 27.
- [256] Brickman TJ, Vanderpool CK, Armstrong SK. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun* 2006;74(3):1741-4.
- [257] Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010 Jan;10(1):36-49.
- [258] Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 1999;17(19):2366-76.
- [259] Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM, Jr., et al. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005 Apr;5(5):1331-45.
- [260] Nilsson CL, Larsson T, Gustafsson E, Karlsson KA, Davidsson P. Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative two-dimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry. *Anal Chem* 2000 May 1;72(9):2148-53.
- [261] Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, et al. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics* 2002 May;2(5):580-90.
- [262] Peng X, Ye X, Wang S. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine* 2004 Jul 29;22(21-22):2750-6.
- [263] Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991 Feb;5(2):171-7.
- [264] Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KH. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology* 1996;87(3):372-80.
- [265] Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KH. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun* 1993;61(8):3190-8.
- [266] Faquim-Mauro EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999 Oct 1;163(7):3572-6.
- [267] Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol* 2000 Dec;12(12):1733-40.

[268] Chen X, Oppenheim JJ, Howard OM. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25-responder T cells than C57BL/6 mice. *J Leukoc Biol* 2005 Jul;78(1):114-21.

[269] Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J Immunol* 2003 Jan 1;170(1):194-200.

# Capítulo 2

## Materiales y Métodos





## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se utilizaron las cepas de *B. pertussis* BP536, un derivado de la cepa salvaje Tohama I resistente a estreptomicina y BP537, una cepa mutante derivada de Tohama I bloqueada en la fase Bvg<sup>-</sup> (avirulenta) [257]. *B. pertussis* BP536 fue transformada con el plásmido pCW505 (gentilmente provisto por el Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) que induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) sin alterar el crecimiento o la expresión de antígenos [258]. En determinados ensayos se utilizaron aislamientos clínicos de *B. pertussis* provenientes de pacientes argentinos infectados durante el período 2.002-2.007.

El cultivo de las bacterias se llevó a cabo según se describió previamente [176]. Brevemente, las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementadas con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs) durante 72 hs. a 37 °C. Posteriormente, se repicaron en una nueva placa de ABGs y se cultivaron a 37 °C durante 24 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo un inóculo para el cultivo en medio líquido Stainer-Scholte (SS) [259] a una densidad celular inicial equivalente a DO (densidad óptica a 650 nm) 0,2 y se cultivó a 37 °C y 160 r.p.m. durante 24 hs. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (10.000 x g, 15 min) y lavadas con solución salina estéril libre de hierro. Volúmenes iguales de la suspensión bacteriana fueron utilizados para inocular 100 ml de SS (SS, 36 µM hierro) y medio SS libre de hierro (SS-Fe, sin el agregado de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), preparado como se describió previamente [176]. Las bacterias fueron cultivadas durante 20 hs (37 °C, 160 r.p.m.) y los cultivos repicados dos veces en el medio de cultivo respectivo.

Para los estudios de regulación de la expresión de proteínas por el sistema de dos componentes BvgAS, *B. pertussis* BP536 fue cultivada en placas ABGs con o sin el agregado de un agente modulador (50 mM MgSO<sub>4</sub>) durante 72 hs. a 37 °C, repicadas a una

nueva placa ABGs con  $\text{MgSO}_4$  y cultivada durante 24 hs a 37 °C. Los cultivos fueron repicados en SS y SS-Fe con y sin el agregado del agente modulador.

En ensayos de clonado y expresión de proteínas recombinantes se emplearon las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, respectivamente. Las mismas fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina en el caso de *E. coli* DH5 $\alpha$  o con 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol en el caso de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.

## 2.2 Detección de sideróforos

La aparición de sideróforo indica que la bacteria está adaptada a la falta de hierro por lo que se empleó el ensayo de CAS para detectar sideróforos en sobrenadantes de cultivos de *B. pertussis* cultivada en SS-Fe. Brevemente, muestras de cultivos de *B. pertussis* en medio SS-Fe y SS fueron centrifugadas para remover las células. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon de tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (Nalgene Co., Rochester, N. Y.) y se le adicionó a un volumen equivalente de solución de cromo azurol S (ensayo CAS) según se describe en Schwyn & Neilands [260]. El cambio de color de azul a pardo-anaranjado indica la presencia de sideróforos, mientras que en ausencia de estos últimos la solución permanece azul. El sobrenadante de *B. pertussis* cultivada en exceso de hierro (medio SS) fue empleado como control negativo.

## 2.3 Células

Neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de sangre humana heparinizada utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis hipotónica logrando una pureza mayor al 95 %. La viabilidad celular se determinó por tinción vital con Trypan blue obteniéndose un nivel de viabilidad superior al 99 %. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0,2 % p/v de BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA), resuspendidos y utilizados inmediatamente. Todos los experimentos descriptos en este

trabajo fueron llevados a cabo utilizando neutrófilos purificados en el momento. El nivel de expresión del receptor FcγRI (CD64) fue monitoreado mediante citometría de flujo utilizando el mAc anti FcγRI 22 (BD Biosciences, San Diego, USA) [261].

## 2.4 Sueros

En este trabajo se utilizó un panel de sueros de pacientes infectados con *B. pertussis* disponible en nuestro laboratorio, así como también inmunoglobulina G (IgG) purificadas a partir de un pool de sueros de pacientes que presentaban un alto título de anticuerpos anti-*B. pertussis* según se determinó mediante ELISA [262].

## 2.5 Proteómica comparativa de *B. pertussis*

*B. pertussis* fue cultivada en SS o SS-Fe, como se describió en la sección 2.1 de este Capítulo. Se realizaron tres cultivos independientes de cada condición. Luego de confirmar la limitación en hierro de los cultivos SS-Fe,  $1 \times 10^7$  bacterias fueron lavadas con H<sub>2</sub>O bidestilada, centrifugadas a 20.000 x g, y solubilizadas con 50 µl de una solución de urea/tiourea (8M/2M). La suspensión celular fue disgregada por sonicación empleando 3 pulsos de 5 min cada uno en frío a 80 % de potencia utilizando el equipo Soniprep 150 (Sanyo). Los lisados celulares se centrifugaron (10.000 x g) durante 1h a 4 °C y los sobrenadantes fueron transferidos a un nuevo vial. La concentración proteica fue determinada mediante Bradford.

Alícuotas de 3 µg de proteína fueron resuspendidas en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 20 mM e incubadas con 2,5 mM de ditioneitol (DTT) durante 1h a 60 °C. Posteriormente las muestras fueron alquiladas mediante incubación con iodoacetamida 10 mM durante 30 min a 37°C en la oscuridad. Las proteínas fueron digeridas por incubación con tripsina (relación 1 µg de tripsina cada 25 µg de proteína) durante 17 horas a 37 °C. La digestión se detuvo por agregado de ácido trifluoroacético (concentración final 1%) y los péptidos fueron desalinizados y purificados utilizando columnas C18ZipTip (Millipore). Las muestras fueron concentradas por centrifugación en vacío. La mezcla peptídica fue fraccionada

mediante nano-HPLC de alta performance (Proxeon nano-LC system, Proxeon, Odense, Denmark) acoplada a un espectrómetro de masa de alta precisión (LTQ-Orbitrap-MS, ThermoElectron, Bremen, Germany) para la identificación peptídica.

Para la identificación de las proteínas, los datos MS/MS fueron recuperados mediante Sorcerer™ v3.5 (Sage-N Research Inc. Milpitas, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas mediante el uso de SEQUEST® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA, version v.27, rev.11), para lo cual SEQUEST® fue configurado con la base de datos del genoma de *B. pertussis*, asumiendo digestión trípica de las proteínas. Además, como variable de modificación se especificó la oxidación de metioninas en SEQUEST®.

La verificación de la identificación de las proteínas asignada por SEQUEST® se realizó mediante el software Scaffold utilizando el programa de búsqueda de bases de datos X!Tandem (Craig and Beavis 2003). La identificación fue aceptada si la misma podía establecerse con más de un 95% de probabilidad y conteniendo al menos dos péptidos identificados.

Con el objetivo de comparar los niveles de expresión de las diferentes proteínas identificadas en las muestras provenientes de SS y de SS-Fe, las cuentas espectrales obtenidas para cada proteína fueron normalizadas. Para ello, el número promedio de espectros en ambas muestras fue dividido por el número total de espectro en SS y en SS-Fe, obteniéndose los valores 0,9 y 1,12, los cuales se usaron para multiplicar las cuentas espectrales en las muestras provenientes de SS y de SS-Fe, respectivamente. Se aplicó el test de Student con un grado de significación (P) de 0.05 para evaluar las proteínas diferencialmente expresadas entre condiciones.

## 2.6 Espectroscopía FT-IR de células enteras de *B. pertussis*

Células enteras de *B. pertussis* cultivadas en SS o SS-Fe fueron analizadas por espectroscopía FT-IR empleando un espectrómetro Spectrum One (Perkin-Elmer, USA) siguiendo el procedimiento descrito por Naumann y colaboradores [263]. Brevemente,



paquetes celulares previamente lavados, fueron resuspendidos en agua destilada ajustándose la DO a un valor de 10. Cien microlitros de cada suspensión de bacterias fueron transferidos a una celda óptica de seleniuro de cinc (ZnSe) y secados por vacío (3-6 kPa) hasta obtener películas transparentes sobre la celda. Los espectros de absorbancia de las distintas muestras fueron adquiridos en el intervalo de lectura de 4.000 y 650  $\text{cm}^{-1}$ . A fin de evitar interferencias debido a vapor de agua, cada espectro fue medido bajo una purga continua de aire seco realizándose 128 escaneos por espectro y empleando una resolución de 6  $\text{cm}^{-1}$ . Todos los espectros adquiridos fueron sometidos a una prueba de calidad espectral. Sólo los que pasaron esta prueba fueron tenidos en cuenta para los estudios posteriores. Previo al análisis, se procedió a realizar la corrección de la línea de base y la normalización vectorial de cada espectro en rango completo de número de onda. El análisis de los espectros se realizó utilizando los software Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer, USA) y OPUS 4.1 (Bruker Optics, USA).

## 2.7 Análisis computacional de IRP1-3 (BP1152)

El análisis de búsqueda de similitud de secuencia para identificar proteínas homólogas a IRP1-3 se llevó a cabo utilizando BLAST. Se seleccionaron aquellas proteínas que presentaron un valor-E  $< 1 \times 10^{-4}$  y se alinearon utilizando el programa CLUSTALX [264]. Para la búsqueda de moldes para construir modelos estructurales, se usaron los métodos de plegado HHpred [265] y FFAS03 [266]. La construcción de los modelos estructurales se realizó empleando el programa Modeller [267]. La calidad de los modelos fue analizada usando PROSA II [268]. La búsqueda de probables regiones transmembrana se llevó a cabo utilizando los servidores TMHMM [269] y DAS [270].

## 2.8 Clonado de genes de *B. pertussis*

Las regiones que codifican para los genes *afuA* (BP1605), *irp1-3* (BP1152) y *lip* (BP2072) de *B. pertussis* fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde ADN genómico de *B. pertussis* y *Pfx* DNA plomierasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). El protocolo general de amplificación consistió de

un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 56 °C, 1 min a 68 °C, y un ciclo final de extensión de 5 min a 68 °C. Los cebadores utilizados para cada gen se describen en la siguiente tabla junto con los respectivos sitios de restricción insertados.

Primer	Secuencia	Sitio de restricción
F-AfuA	AAGGATCCCCGTCGACCAAGCGTTC	BamHI
R-AfuA	ACCTAAGCTTTCAGTTGTCGAAGCCCACC	HindIII
F-IRP1-3	AGCGTCGACTGATGAAGAAAGCCTTGCTAC	Sall
R-IRP1-3	ACTAAGCTTTCAGTACCCGCCCTTCTTG	HindIII
F-Lip	GCGGATCCCAGATCGTCAAATTGCTTAC	BamHI
R-Lip	ACGTAAGCTTCTACGGCTTGGGAGG	HindIII

El producto de PCR correspondiente a cada gen fue digerido con las correspondientes enzimas de restricción y ligado dentro del plásmido de expresión pET28a (Novagen, Madison, WI) para generar la respectiva proteína recombinante con un tag de histidinas en su extremo amino terminal. Células competentes de *E. coli* DH5a fueron transformadas con cada una de las mezclas de ligación y sembradas en placas de LB suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina. Los clones positivos fueron confirmados por PCR. Posteriormente se realizó la purificación de ADN plasmídico por Miniprep (Promega) a partir de cultivos crecidos durante 12 hs. Las secuencias nucleotídicas de las distintas construcciones plasmídicas fueron secuenciadas para confirmar ausencia de mutaciones introducidas por PCR (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

## 2.9 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Las distintas construcciones plasmídicas fueron utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. Para la inducción de la expresión de rAfuA y rIRP1-3, las bacterias transformadas fueron cultivadas a 37 °C hasta alcanzar una DO de 0,4, momento en el cual se agregó isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 0,5 mM y se continuó el cultivo durante 3 hs. La expresión de rLip resulta tóxica para la bacteria, por lo que el protocolo de inducción fue modificado, induciéndose la expresión de la proteína a DO 0,8, se agregó IPTG a una concentración final 0,5 mM y se continuó el cultivo durante 1 h. En todos los casos las proteínas recombinantes se encontraron formando cuerpos de inclusión en la fracción insoluble de los lisados bacterianos. Para facilitar la solubilización de tales cuerpos de inclusión, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y suspendidas en buffer desnaturizante conteniendo 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 10 mM imidazol, pH 7,4. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 10.000 x g por 20 min y cada una de las proteínas recombinantes en el sobrenadante fueron purificadas por afinidad en una columna cargada con una resina de cobalto (HisPur™ Cobalt Resin, Pierce, Rockford, IL) previamente equilibrada con buffer desnaturizante. La columna fue lavada con el mismo buffer para eliminar las proteínas no unidas y la elución de las proteínas recombinantes fue realizada con buffer 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 150 mM imidazol, pH 7,4. La pureza de cada una de las proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE 10% y tinción con plata. Las proteínas fueron dializadas y liofilizadas. Para eliminar una posible contaminación con LPS las proteínas recombinantes fueron tratadas con una resina de Polmixina B (Sigma). La concentración de LPS en las proteínas purificadas, determinada mediante *Limulus amoebocyte lysate* (Sigma), indicó que todas las preparaciones contenían menos de 0,25 unidades de endotoxina/ $\mu$ g de proteína.

## 2.10 Inmunización de ratones

En ensayos con animales se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 3 y 5 semanas obtenidos y criados en salas de cría libres de patógenos de las instalaciones del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata.

En los ensayos de inmunización, grupos de 10 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con 4 µg de rAfuA, rIRP1-3 o rLip formuladas con adyuvante de Freund completo (AFC). Transcurridos 19 días, se realizó una segunda inmunización (refuerzo) con la respectiva proteína recombinante formulada con adyuvante de Freund incompleto (AFI). Otros dos grupos de 10 ratones fueron inmunizado i.p. los días 0 y 19 con células de *B. pertussis* cultivadas en exceso o en limitación de hierro inactivadas por calor formuladas con hidróxido de aluminio [Al (OH)<sub>3</sub>]. Un sexto grupo de 10 ratones se inmunizó con rLip en PBS siguiendo el mismo esquema de vacunación. Por otro lado, en ensayos realizados con vacuna acelular (Pa), grupos de 10 ratones fueron inmunizados con 1/6 de la dosis humana de la vacuna Pa comercial *Infanrix*<sup>TM</sup>, Pa con el agregado de 4 µg de rAfuA, Pa con el agregado de 4 µg de rIRP1-3 o Pa con el agregado de 4 µg de rAfuA y 4 µg de rIRP1-3, recibiendo un refuerzo el día 19 con la respectiva vacuna. En todos los ensayos un grupo de 10 ratones inmunizados con adyuvante solo fue utilizado como control negativo. Se agregó además un grupo de 10 ratones inmunizados con PBS como control

Todos los ratones fueron sangrados a los días 0, 19 y 34. El suero fue separado y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

## 2.11 Puesta a punto de la infección intranasal

Dos grupos de 20 ratones naïve fueron sedados e infectados por instilación en las fosas nasales con 50 µl de PBS conteniendo  $1,5 \times 10^6$  UFC de *B. pertussis* BP536 cultivada en SS o SS-Fe. Transcurridas 2 hs, y 1, 7 y 14 días después de la infección, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones. Los mismos fueron homogeneizados en PBS y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones (UFC/pulmón) por dilución seriada y recuento en placas de ABGs suplementadas con 20

µg/ml de estreptomicina. El límite de detección inferior se estableció en 10 UFC. La determinación de las UFC en los pulmones luego de las 2 hs de realizada la infección sirvió para determinar la carga bacteriana inicial.

## 2.12 Desafío de ratones inmunizados

En ensayos de protección activa, ratones inmunizados i.p. (n=10), según se describió en la sección 2.10 fueron sedados y desafiados por instilación en las fosas nasales con 50 µl de PBS conteniendo  $1,5 \times 10^6$  UFC de *B. pertussis* BP536 cultivada en SS-Fe 15 días después de la última inmunización. Transcurridos 3 días después de la infección, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones. Se determinó las UFC en los pulmones según se describió en la sección anterior.

## 2.13 Determinación de producción citoquinas por esplenocitos

Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados i.p. con rAfuA, rIRP1-3 formuladas con AF o con AF solo, los días 0 y 19. Transcurridos 15 días después de la segunda inmunización, se extrajeron los bazos y se aislaron los esplenocitos según ha sido previamente descrito [271]. Brevemente, los bazos fueron homogeneizados y las células rojas lisadas con 0,84% de NH<sub>4</sub>Cl. Los esplenocitos fueron resuspendidos en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1mM de piruvato de sodio, 100 µg/ml de penicilina y estreptomicina. Placas de cultivo celular de 96 pocillos fueron sembradas con  $2 \times 10^6$  células/pocillo y los esplenocitos estimulados con 40 µg/ml de la respectiva proteína recombinante, DMEM sólo (control negativo) o 2,5 µg/ml de concanavalina A (ConA) (control positivo). Luego de 3 días, los sobrenadantes fueron recuperados y se analizó la producción de INF-γ e IL-10 en los mismos mediante ELISA de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante (BD Biosciences, San Diego).

## 2.14 Ensayos de ELISA

Para la evaluación del título de anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 y anti-rLip, se pusieron a punto ensayos de inmunoabsorción (ELISAs) mediante los cuales se determinó en nivel de anticuerpos dirigidos contra cada proteína en muestras de suero de ratones inmunizados naïve, o inmunizados con cada proteína según se describió en la sección 2.10. Se evaluaron PBS y buffer carbonato como buffers de disolución de las proteínas para realizar la sensibilización, así como también distintas concentraciones de cada una de las proteínas recombinantes. Las condiciones seleccionadas como óptimas son las que se describen a continuación. Brevemente, placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc Denmark) se sensibilizaron con 100 µl de una solución conteniendo 10 µg/ml de proteína recombinante en buffer 0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,6 durante 12 hs a 4 °C. Los pocillos fueron luego lavados tres veces con solución PBS-0.05 % v/v Tween 20 (PBS-T) y se realizó el bloqueo de sitios libres remanentes con 300 µl por pocillo de una solución PBS-10 % p/v leche descremada (PBS-L) durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros de ratones anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-rLip, de suero normal de ratón y de sueros de individuos infectados con *B. pertussis* en PBS-L suplementada con 0.05 % v/v de Tween 20 (PBS-LT). Transcurrida la etapa de bloqueo, se agregaron 100 µl de las diluciones de los distintos sueros a los pocillos sensibilizados con la respectiva proteína recombinante y se incubó durante 2 hs a 30 °C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS-LT se adicionaron 100 µl por pocillo de anti-IgG humana o de ratón (ambas de Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike), anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón (ambas de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) conjugados a peroxidasa diluido en PBS-LT. Se incubó durante 2 hs a 37 °C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con PBS-T y se agregó 100 µl por pocillo de sustrato para peroxidasa, orto-fenilendiamina, preparado en buffer fosfato/citrato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 M Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> / 0,1 M ácido cítrico / 0,001 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Transcurridos 15 min, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl por pocillo de solución 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se determinó la absorbancia a 492 nm (Spectra Rainbow, Texas).

En ensayos de ELISA con bacterias enteras, las placas fueron sensibilizadas con *B. pertussis* cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe)

inactivadas por calor a 56 °C durante 30 min o con bacterias vivas resuspendidas en PBS (DO 0,1).

Los valores de  $A^{492}$  se transformaron a la función LogitP y se graficó LogitP vs. 1/dilución. El título de anticuerpos presente en la muestra problema es la dilución a la cual LogitP=0

$$\text{LogitP} = \ln(P/(1-P))$$

$$P = (A - A_0)/(A_m - A_0)$$

donde A es el valor de  $A^{492}$  de la muestra,  $A_0$  es el valor de  $A^{492}$  de la mayor dilución y  $A_m$  es el valor de  $A^{492}$  de la menor dilución.

## 2.15 Ensayos de Opsonización

Bacterias cultivadas en medio SS-Fe se utilizaron para determinar la capacidad opsonizante de sueros de ratón anti-rAfuA y anti-rIRP1-3. Brevemente, 60 µl de bacterias (conteniendo  $1.2 \times 10^8$  bacterias) se incubaron con 30 µl de suero anti-rAfuA, suero anti-rIRP1-3 o suero normal de ratón durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS, y se incubaron 30 min a 4 °C con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (PE) o conjugados con CY3 (Molecular Probes, OR, USA). Luego de un lavado final con PBS las bacterias fueron fijadas con paraformaldehído 4 %. Las muestras tratadas con anti-IgG de ratón conjugados con PE fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences), mientras que las tratadas con anti-IgG de ratón conjugados a CY3 fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland).

## 2.16 Cuantificación de la Fagocitosis

La fagocitosis de *B. pertussis* fue evaluada según se ha sido descrito por Rodríguez y colaboradores [272] con algunas modificaciones. Brevemente, bacterias-GFP cultivadas en exceso o en ausencia de hierro fueron incubadas con PMN durante 10 min a 37 °C en

una relación inicial bacteria/célula ( $R_{ib/c}$ ) de 200. Las células fueron luego extensivamente lavadas a 4 °C para remover aquellas bacterias no adheridas y divididas en dos alícuotas. Una alícuota fue mantenida en hielo para determinar el número inicial de bacterias adheridas al neutrófilo, mientras que la otra alícuota fue incubada durante 40 min más para permitir que la fagocitosis transcurra. La fagocitosis se detuvo colocando en hielo las muestras. Para determinar el número de bacterias asociadas a la superficie celular de los neutrófilos de ambas alícuotas se empleó marcación con anticuerpos fluorescentes. Para ello, los PMN fueron incubados con suero policlonal anti-*B. pertussis* de conejo (30 min a 4 °C) seguido de fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con PE o conjugados con CY3 (Molecular Probes, OR, USA) durante 30 min a 4 °C. Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero humano inactivado por calor. Aquellas muestras incubadas con anti-IgG conjugados con PE fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia roja y verde de los neutrófilos mantenidos durante 10 min a 37 °C fueron utilizadas como control de adhesión. El decaimiento en la fluorescencia roja luego de 40 min de incubación a 37 °C reflejó el nivel de fagocitosis de las bacterias asociadas a la superficie. La fagocitosis se expresa como GFP asociada a PMN debido a las bacterias fagocitadas, y se calcula de la siguiente manera:  $GFP1 \times (1-PE2/PE1)$ , donde GFP1 es la media de la fluorescencia verde asociada a PMN mantenidas a 37 °C durante 10 min, PE1 es la media de la fluorescencia roja de los PMN GFP-positivos mantenidos a 37 °C durante 10 min, y PE2 es la media de la fluorescencia roja de PMN GFP-positivos mantenidos durante 40 min más a 37 °C. Los PMN marcados con anti-IgG conjugados a CY3 se utilizaron para analizar la fagocitosis bacteriana mediante microscopía de doble fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland).

En determinados experimentos, GFP-*B. pertussis* cultivada en limitación de hierro, fue opsonizada con suero anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-Prn o suero normal de ratón (control negativo), según lo descrito en el inciso 2.14, previo a la incubación con los neutrófilos ( $R_{ib/c}$  de 50). Los ensayos de fagocitosis fueron realizados como ha sido detallado anteriormente, con la diferencia que la marcación de las bacterias adheridas a la superficie fue realizada mediante la incubación con fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos de



cabra anti-IgG de ratón conjugados con PE o conjugados con CY3 (Molecular Probes, OR, USA)

## 2.17 Ensayos de Western Blot

Para los ensayos de inmunodetección, muestras proteicas fueron obtenidas a partir de suspensiones bacterianas de *B. pertussis* BP536, *B. pertussis* BP537 o aislados clínicos cultivadas en exceso o limitación de hierro. En determinados ensayos las bacterias fueron cultivadas en presencia de un agente modulador (50 mM MgSO<sub>4</sub>) tanto en exceso como en ausencia de hierro. Muestras conteniendo igual cantidad de proteínas fueron tratadas con buffer Laemmli y analizadas mediante SDS-PAGE 10%. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF Millipore, Bedford, MA, USA) [273]. Las membranas fueron incubadas con antisueros de ratón anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-rLip o anti-FHA durante 2 hs a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike) y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

En determinados experimentos, las muestras proteicas fueron obtenidas a partir de sobrenadantes de *B. pertussis* cultivadas bajo limitación de hierro sometidas a tratamiento térmico a 56 °C durante 30 min, o sobrenadantes de las bacterias sin tratar. Los ensayos de western blot fueron realizados como se describió más arriba utilizando anticuerpos anti-rAfuA para la inmunodetección.

## 2.18 Ensayos de Dot Blot

Para la inmunodetección mediante dot blot, muestras cada una de las proteínas recombinantes en estudio se aplicaron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente en solución de bloqueo [PBS, 0.05 % v/v Tween 20, 5 % p/v albúmina bovina (BSA)], y luego durante otras 2 hs a temperatura ambiente con sueros de ratones inmunizados con rAfuA, rIRP1-3 o rLip. Como control

negativo se utilizó suero normal de ratón. Luego de los lavados con solución PBS + 5 % p/v BSA, la unión específica de anticuerpos IgG se visualizó mediante incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson, ImmunoResearch, BaltimorePike) como anticuerpo secundario y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

## 2.19 Análisis de conservación de secuencias de genes en aislados clínicos

Las regiones que codifican para los genes *afuA* (BP1605), *irp1-3* (BP1152) y *lip* (BP2072) fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *Pfx* DNA plomierasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y como molde ADN genómico de *B. pertussis* cepa Tohama (control positivo) o de 14 aislados clínicos. El protocolo general de amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 56 °C, 1 min a 68 °C, y un ciclo final de extensión de 5 min a 68 °C. Los cebadores utilizados para cada gen se describen en la siguiente tabla

Primer	Secuencia
F-AfuA	GTGCGTTCCTGTCCTGCCG
R-AfuA	GCGGGCGTGAGTGTAGCGC
F-IRP1-3	GGGATCTGTAAGCCGAACC
R-IRP1-3	AATGCCATGGCCAGCAAG
F-Lip	TCACACGTCGCTACACAGG
R-Lip	CGCTTGCTCATCGGCGC

Los productos de PCR fueron analizados mediante geles de agarosa para confirmar conservación del tamaño de los genes. Las secuencias nucleotídicas de cada gen de las distintas cepas fueron secuenciadas (Macrogen Inc., Seoul, Korea) y comparadas con la

respectiva secuencia de *B. pertussis* Tohama, mediante el uso del programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) para evaluar conservación de la secuencia.

## 2.20 Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos se analizaron empleando análisis de varianza (ANOVA) o *t*-test. Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (P) <0.05.



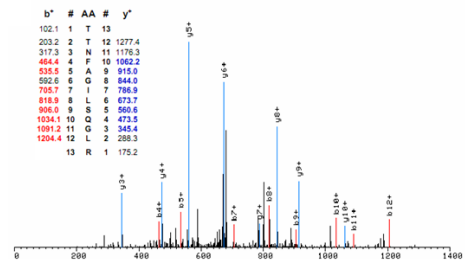
## Referencias

- [1] Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2637-41.
- [2] Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Peppler M, Weiss AA. Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 1999;67(8):4264-7.
- [3] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [4] Stainer DW, Scholte MJ. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 1970 Oct;63(2):211-20.
- [5] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 1987;160(1):47-56.
- [6] Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, et al. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991;78(4):885-9.
- [7] Nagel J, de Graaf S, Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev Biol Stand* 1985;61:325-30.
- [8] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 1991 May 2;351(6321):81-2.
- [9] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-80.
- [10] Soding J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 2005;21(7):951-60. Epub 2004 Nov 5.
- [11] Jaroszewski L, Rychlewski L, Li Z, Li W, Godzik A. FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 2005;33(Web Server issue):W284-8.
- [12] Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234(3):779-815.
- [13] Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 1993 Dec;17(4):355-62.
- [14] Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1998;6:175-82.

- [15] Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* 1997;10(6):673-6.
- [16] Pilione MR, Harvill ET. The *Bordetella bronchiseptica* type III secretion system inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody-mediated bacterial clearance. *Infect Immun* 2006;74(2):1043-9.
- [17] Rodriguez ME, Van der Pol WL, Van de Winkel JG. Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera. *J Immunol Methods* 2001;252(1-2):33-44.
- [18] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4.

# Capítulo 3

## Análisis del fenotipo de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro







### 3. Análisis del fenotipo de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro

#### 3.1 Introducción

La plasticidad fenotípica que presentan las bacterias les permite adaptarse a las distintas condiciones de entorno, lo que constituye una de sus ventajas evolutivas: el tipo de nutriente limitante del crecimiento modela la respuesta fenotípica. En general la adaptación involucra cambios más o menos profundos en la composición macromolecular de la bacteria y, en particular, del proteoma. Dentro del hospedador los patógenos se encuentran en un entorno con disponibilidad variada de nutrientes según el sitio en el que se encuentren, pero la disponibilidad de hierro siempre es baja por las razones que se mencionan en el Capítulo 1. El estudio del perfil de cambios en la expresión génica durante la infección señala como prevalentes a aquellos genes involucrados en la adquisición de nutrientes, entre los cuales el hierro parecería jugar un papel esencial [1]. De hecho, se ha demostrado que la baja disponibilidad de hierro es uno de los factores de stress más importantes que la bacteria enfrenta *in vivo* e induce cambios fenotípicos profundos a nivel del proteoma y de la estructura antigénica de la bacteria [1, 2]. En el caso particular de *B. pertussis* los tres sistemas de captura de hierro conocidos, el sistema del sideróforo alcaligina, el sistema del xenosideróforo enterobactina y el sistema de adquisición de hemo [3], se expresan a lo largo de la infección del tracto respiratorio de ratones.[2]. Como ya se mencionó, *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano sin reservorio conocido por fuera del hombre. De esta forma la bacteria infectante proviene de otro hospedador y por lo tanto estará adaptada a la limitación de hierro. Por esta razón el estudio del proteoma inducido en estas condiciones resulta de particular interés no solo para una mejor comprensión de la interacción de la bacteria con el hospedador sino además por la posibilidad de identificar nuevos inmunógenos protectores.

Distintos estudios se han realizado con el objetivo de estudiar el fenotipo de *B. pertussis* inducido por limitación de hierro. Los primeros análisis se llevaron a cabo empleando electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) y permitieron observar la

expresión de distintas proteínas inducida bajo esta condición [4, 5]. Más adelante, el uso de técnicas de biología molecular permitió la identificación de posibles receptores de sideróforos [6, 7]. La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *B. pertussis* [8], junto con la mejora de las técnicas de identificación de proteínas, como es la espectrometría de masa (MS) por desorción-ionización de matriz asistida por láser (MALDI), permitió estudiar la expresión del genoma de este patógeno mediante proteómica [9], una técnica que consiste en la separación de proteínas a partir de una mezcla compleja, seguida de la identificación de cada proteína individual. Existen dos grandes grupos de técnicas de separación de las proteínas: las que se basan en la resolución de proteínas intactas y que utilizan principalmente técnicas de electroforesis bidimensional (2-DE) seguida por identificación por espectrometría de masa de los spots de proteínas separados por la electroforesis, y las que se basan en la degradación proteolítica de las proteínas y su posterior separación por cromatografía líquida.

Previamente, nuestro grupo ha hecho uso de una de éstas técnicas, empleando electroforesis bidimensional para llevar a cabo un estudio de proteómica comparativa que permita estudiar el proteoma de *B. pertussis* inducido por limitación de hierro [9]. La electroforesis 2-DE se basa en la combinación de dos técnicas ortogonales (es decir que no comparten principios físicos comunes): 1) la separación por carga eléctrica (isoelectroenfoque), en la que las proteínas migran en un gradiente de pH hasta alcanzar el correspondiente a su punto isoelectrónico y 2) la separación por tamaño molecular, que se realiza mediante SDS-PAGE. En el estudio realizado por nuestro grupo, se evaluaron dos rangos de pH, 4-7 y 6-11. Se detectó un total de 900 y 210 proteínas respectivamente, independientemente de la condición de cultivo [9]. El análisis de la expresión diferencial de proteínas en bacterias cultivadas en limitación de hierro en comparación con el cultivo en exceso de hierro, permitió identificar un total de 23 proteínas, 8 con mayor expresión en condiciones de exceso de hierro y 15 con mayor expresión en condiciones de limitación de hierro [9]. Además, el análisis del sub-proteoma de membrana externa condujo a la identificación de 12 proteínas sobre-expresadas bajo limitación de hierro presentes en esta fracción [9]

Si bien la proteómica 2-DE permitió identificar cierto número de proteínas expresadas diferencialmente por *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro, es importante mencionar que la electroforesis bidimensional presenta algunas limitaciones que se trasladan al análisis proteómico. Proteínas de muy alto o muy bajo peso molecular son difíciles de detectar por la escasa resolución del SDS-PAGE en estas zonas. Por otro lado, las proteínas hidrofóbicas, debido a su escasa solubilidad están sub-representadas en los mapas electroforéticos y las proteínas que poseen puntos isoelectricos muy ácidos o básicos son difíciles de focalizar y por lo tanto se dificulta su detección mediante electroforesis 2-DE. Entre las técnicas que se basan en la degradación proteolítica de las proteínas previo a su separación, se encuentra proteómica *shotgun*, una estrategia basada en la combinación de digestión proteica y secuenciamiento de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y que permite ampliar el espectro de proteínas identificadas [10]. El alto rendimiento obtenido mediante esta técnica se debe a varios factores. Por un lado, la digestión proteolítica de las proteínas en péptidos simplifica el secuenciamiento mediante MS/MS, ya que los péptidos se fragmentan más fácilmente que las proteínas intactas. Por otro lado, el reemplazo de la separación bidimensional de las proteínas mediante electroforesis por otras técnicas, como por ejemplo nano-HPLC, simplifica el manejo de las muestras. En el presente estudio se completó el análisis proteómico de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro mediante el uso de proteómica *shotgun*, con el objetivo de ampliar la caracterización inicial del proteoma llevada a cabo por nuestro grupo [9].



## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Perfil proteico de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro

Muestras de proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en exceso o limitación de hierro, fueron digeridas con tripsina. Los péptidos fueron separados mediante nano-HPLC de alta performance e identificados mediante espectrometría de masa, según se describe en el Capítulo 2.

El perfil proteico de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro en comparación con el perfil de la bacteria cultivada en exceso de hierro mostró un total de 273 proteínas con expresión diferencial, entre las cuales se encuentran 17 proteínas previamente identificadas por nuestro grupo mediante 2-DE [9]. La limitación de hierro indujo un aumento de expresión significativo de 144 proteínas, mientras que 129 proteínas presentaron un menor nivel de expresión bajo estas condiciones (Tabla 1 y 2 respectivamente).

Como se mencionó anteriormente, la técnica *shotgun* permite la identificación de proteínas de alto y bajo peso molecular que la técnica 2-DE no es capaz de resolver. Como puede observarse en las Tablas 1 y 2, en este estudio se identificaron un total de 38 proteínas de peso molecular por debajo de 20 kDa, de las cuales 14 presentan mayor expresión en limitación de hierro y 24 lo hacen en exceso de hierro. Además, se encontraron un total de 33 proteínas de peso molecular mayor a 80 kDa con expresión diferencial, 7 con expresión aumentada bajo limitación de hierro y 26 con mayor expresión en exceso de hierro.



Tabla 1. Proteínas de *B. pertussis* cuyo nivel de expresión aumenta en limitación de hierro

N° ORF	Nombre	kDa	Descripción	Posible Localización celular	Cuentas espectrales normalizadas SS	Cuentas espectrales normalizadas SS-Fe
BP0047	MetX	45 kDa	Homoserin-O-acetiltransferasa	Desconocida	0,00	4,29
BP0169	BP0169	23 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,34	1,81
BP0174*	Bfr	18 kDa	Bacterioferritina	Citoplasmática	4,95	9,13
BP0182	BP0182	38 kDa	Proteína de unión a hierro y azufre putativa	Membrana citoplasmática	0,00	1,46
BP0193***	SodA	23 kDa	Superóxido dismutasa [Mn]	Periplásmica	0,00	3,23
BP0195	GcvT	39 kDa	Aminometiltransferasa	Citoplasmática	1,07	7,23
BP0217	BP0217	34 kDa	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	Citoplasmática	2,52	5,45
BP0221	CatI	24 kDa	3-oxoadipato Co-A transferasa, subunidad A	Citoplasmática	2,87	5,45
BP0241	BP0241	25 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	0,00	1,09
BP0248***	FumC	50 kDa	Fumarato hidratasa	Citoplasmática	2,44	24,74
BP0343	BhuV	28 kDa	Componente de unión a ATP del sistema transportador de hemina	Membrana citoplasmática	0,00	1,80

			putativo			
BP0346***	BhuS	38 kDa	Proteína de transporte de hemina putativa	Citoplasmática	0,00	12,64
BP0347**	BhuR	92 kDa	Receptor de grupo hemo de membrana externa	Membrana externa	0,34	44,13
BP0383	ArgB	32 kDa	Acetilglutamato kinasa	Citoplasmática	10,30	14,89
BP0465	BP0465	51 kDa	Probable aldehído deshidrogenasa	Citoplasmática	2,52	6,16
BP0490	DnaN	41 kDa	DNA plimerasa III, subunidad beta	Citoplasmática	17,01	19,93
BP0604*	SecB	19 kDa	Proteína de exportación SecB	Citoplasmática	8,59	12,71
BP0624	BP0624	55 kDa	Acil-CoA sintasa	Citoplasmática	0,00	13,70
BP0625	BP0625	43 kDa	Probable acil-CoA deshidrogenasa	Citoplasmática	0,00	10,83
BP0627	BP0627	28 kDa	Probable enoil-CoA hidratasa/isomerasa	Citoplasmática	6,36	22,26
BP0628	BP0628	35 kDa	Piruvato deshidrogenasa E1 putativa, subunidad beta	Citoplasmática	4,23	14,58
BP0629	PdhA	35 kDa	Piruvato deshidrogenasa E1 putativa, subunidad alfa	Citoplasmática	0,68	14,82
BP0678	PrfA	40 kDa	Factor 1 liberador de cadena peptídica	Citoplasmática	0,00	1,09



BP0683	BP0683	38 kDa	4,5-hidroxifitalato descarboxilasa	Citoplasmática	8,46	15,98
BP0795	Pnp	77 kDa	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa	Citoplasmática	40,58	50,02
BP0873	Tpm	25 kDa	Tiopurina S-metiltransferasa	Citoplasmática	0,34	4,74
BP0900	BP0900	30 kDa	Probable oxido-reductasa	Citoplasmática	1,37	3,61
BP0901	BP0901	36 kDa	Oxido-reductasa putativa	Citoplasmática	0,00	5,11
BP0958	CysM	32 kDa	Cisteína sintasa B	Citoplasmática	3,16	8,01
BP0962	EtfA	31 kDa	Flavoproteína transportadora de electrones, subunidad alfa	Desconocida	14,40	25,04
BP0964	BP0964	65 kDa	Probable acil-CoA deshidrogenasa	Citoplasmática	0,34	6,17
BP0993**	AceE	101 kDa	Piruvato deshidrogenasa, componente E1	Citoplasmática	22,55	37,64
BP0994	AceF	57 kDa	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	Citoplasmática	16,20	27,87
BP0995	LpdA	62 kDa	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	Citoplasmática	18,17	33,84
BP1038	CorC	33 kDa	Proteína de eflujo de magnesio y cobalto	Membrana citoplasmática	3,88	6,91
BP1102	LysS	57 kDa	Lisil tRNA sintetasa	Citoplasmática	11,37	14,45
BP1112**	BipA	137 kDa	Proteína putativa de membrana externa	Membrana externa	77,83	111,08

			de unión a ligando			
BP1125	OdhB	42 kDa	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	Citoplasmática	26,29	37,24
BP1150	PhbB	26 kDa	Acetoacetyl-CoA reductasa	Citoplasmática	4,27	9,03
BP1151	BP1151	22 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	5,29	8,75
BP1152***	IRP1-3	19 kDa	Proteína hipotética	Periplásmica	3,50	36,2
BP1163	BP1163	27 kDa	Probable deshidrogenasa de cadena corta	Citoplasmática	0,73	3,99
BP1202	BP1202	25 kDa	Regulador transcripcional de la familia TetR	Desconocida	0,73	2,89
BP1211***	BP1211	29 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,00	7,97
BP1262	Rho	47 kDa	Factor de terminación de transcripción Rho	Citoplasmática	23,42	26,81
BP1277	LivJ	39 kDa	Precursor de proteína de unión a leu/ile/val	Periplásmica	4,27	7,63
BP1296	BP1296	30 kDa	Lipoproteína putativa	Desconocida	6,02	11,28
BP1359	BP1359	42 kDa	Mandelato racemasa putativa	Citoplasmática	1,11	11,62
BP1360	BP1360	32 kDa	Ketopantoato reductasa putativa	Citoplasmática	3,59	20,41
BP1445	BP1445	42 kDa	Probable acyl-CoA deshidrogenasa	Citoplasmática	0,00	3,61

BP1446	BP1446	42 kDa	Enoil-CoA hidratasa	Citoplasmática	1,07	2,56
BP1447	MmsB	30 kDa	3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa	Citoplasmática	2,52	7,26
BP1451	Tal	35 kDa	Transaldolasa	Citoplasmática	3,55	7,63
BP1487	SmoM	40 kDa	Proteína periplásmica de unión a solutos putativa	Desconocida	5,64	10,87
BP1547**	BP1547	97 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	0,00	1,09
BP1561	BP1561	47 kDa	Proteína hipotética	Membrana externa	0,34	17,01
BP1565*	BP1565	8 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,39	3,61
BP1575	GlnQ	27 kDa	Componente de unión a ATP del transportador ABC de glutamina	Membrana citoplasmática	1,37	3,65
BP1605***	AfuA	37.5kDa	Proteína de unión a hierro putativa	Periplásmica	15,04	37,60
BP1630	WbpP	37 kDa	Proteína de biosíntesis de polisacárido capsular	Citoplasmática	10,60	14,17
BP1795	TyrB	43 kDa	Aspartato aminotransferasa	Citoplasmática	21,20	27,87
BP1799	IscS	45 kDa	Cisteína desulfurasa	Citoplasmática	0,68	5,45
BP1800*	IscU	14 kDa	Proteína de formación/reparación del cluster [Fe-S]	Citoplasmática	1,41	3,95
BP1838	BP1838	20 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	2,86	4,36

BP1852	BP1852	27 kDa	Precursor de proteína periplásmica de unión a glutamina putativo	Periplásmica	1,07	6,16
BP1906***	PpiB	19 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	Citoplasmática	10,64	15,71
BP1962***	BfrI	78 kDa	Receptor de sideróforo férrico putativo	Membrana externa	0,34	19,25
BP2016	BrfB	79 kDa	Receptor de sideróforo férrico putativo	Membrana externa	0,34	19,00
BP2057	BP2057	46 kDa	Proteína de unión a ATP de transportador ABC putativa	Membrana citoplasmática	1,37	3,61
BP2068	BP2068	34 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	2,48	6,51
BP2072***	Lip	22 kDa	Lipoproteína putativa	Desconocida	5,09	14,99
BP2156	BP2156	24 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	1,07	2,52
BP2212	Fhp	44 kDa	Flavohemoproteína	Citoplasmática	0,68	4,29
BP2283	Qor	35 kDa	Quinona oxido-reductasa	Citoplasmática	5,34	12,81
BP2291	BP2291	39 kDa	Tartrato deshidrogenasa	Citoplasmática	0,34	5,12
BP2307	BP2307	57 kDa	Proteína de unión a ATP conservada	Desconocida	3,16	6,85
BP2317	BP2317	55 kDa	Ribonucleasa putativa	Citoplasmática	0,00	2,93
BP2377	BP2377	62 kDa	Proteína de unión a AMP putativa	Citoplasmática	1,41	9,06
BP2379	HslO	34 kDa	Chaperona putativa	Citoplasmática	0,00	2,15

BP2393	BP2393	40 kDa	Probable D-aminopeptidasa	Desconocida	0,00	1,09
BP2397	BP2397	69 kDa	Subunidad de unión a ATP de transportador ABC putativa	Citoplasmática	1,07	5,04
BP2398	BP2398	34 kDa	L-asparaginasa putativa	Periplásmica	0,34	4,33
BP2411*	BP2411	14 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	6,37	12,77
BP2434	MucD	52 kDa	Serín proteasa	Periplásmica	13,37	21,29
BP2441	FabG	26 kDa	3-cetoacil-(proteína transportadores de acil) reductasa	Citoplasmática	5,34	7,25
BP2457	AlcB	23 kDa	Proteína de biosíntesis de alcalignina	Desconocida	0,00	1,43
BP2458***	AlcC	70 kDa	Proteína de biosíntesis de alcalignina	Citoplasmática	0,39	12,23
BP2463**	FauA	82 kDa	Receptor de alcalignina férrica	Membrana externa	0,00	7,15
BP2470	SerS	50 kDa	Seril-tRNA sintetasa	Citoplasmática	4,71	9,06
BP2474	TrxB	34 kDa	Tiorredoxina reductasa	Desconocida	6,75	10,15
BP2493	BP2493	33 kDa	Proteína de unión a ATP putativa	Citoplasmática	2,09	6,13
BP2497**	BP2497	101 kDa	Zinc-proteasa putativa	Membrana externa	23,12	33,90
BP2625	GuaB	52 kDa	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	Citoplasmática	24,23	32,63
BP2644	BP2644	57 kDa	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Citoplasmática	0,00	2,52

			putativa			
BP2652*	BP2652	17 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,00	3,99
BP2693	BP2693	59 kDa	Gamma-glutamyltranspeptidasa putativa	Periplásmica	6,63	13,77
BP2699*	GlnB	12 kDa	Proteína reguladora de nitrógeno	Membrana citoplasmática	2,48	5,04
BP2702	ArgH	52 kDa	Argininosuccinato liasa	Citoplasmática	7,44	16,80
BP2703	BP2703	21 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,68	3,99
BP2709*	MoaE	18 kDa	Factor de conversión de molibdopterina	Citoplasmática	0,34	2,90
BP2715*	BP2715	18 kDa	Proteína de la familia AhpC/TSA	Desconocida	3,93	6,89
BP2726	BP2726	25 kDa	Oxido-reductasa putativa	Citoplasmática	1,80	8,72
BP2743	BP2743	26 kDa	Componente de unión a ATP de transportador ABC putativo	Citoplasmática	4,99	9,06
BP2744	BP2744	29 kDa	Componente de unión a ATP de transportador ABC putativo	Citoplasmática	2,82	11,82
BP2747****	BP2747	41 kDa	Proteína putativa de unión a soluto de transportador ABC	Periplásmica	26,74	37,83
BP2749**	PutA	137 kDa	Prolina oxido-reductasa/represor transcripcional	Citoplasmática	15,85	30,83

BP2841	BP2841	25 kDa	Deshidrogenasa de cadena corta putativa	Citoplasmática	2,87	8,07
BP2948	BP2948	41 kDa	Deaminasa riboflavina específica putativa	Citoplasmática	0,00	1,47
BP2952***	GlyA	45 kDa	Serín hidroximetiltransferasa	Citoplasmática	23,11	34,67
BP2960	ArgC	38 kDa	N-acetil-gamma-glutamyl-fosfato reductasa	Citoplasmática	10,64	21,12
BP2964	BP2964	49 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	6,75	10,19
BP2996	FabG	50 kDa	Acetil-CoA carboxilasa	Citoplasmática	7,44	13,49
BP3012	BP3012	37 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	0,00	1,09
BP3017	LpxC	34 kDa	UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-acetilglucosamina deacetilasa	Citoplasmática	0,00	5,72
BP3021	Ddl	34 kDa	D-alanilalanina sintetasa	Citoplasmática	8,89	12,78
BP3071	MetK	42 kDa	S-adenosilmetionina sintetasa	Citoplasmática	14,32	21,84
BP3130	BP3130	36 kDa	Ciclasa putativa	Citoplasmática	14,15	22,90
BP3154	ThyA	36 kDa	Timidilato sintasa	Citoplasmática	4,61	8,35
BP3222	OmpR	26 kDa	Regulador de respuesta de dos componentes	Citoplasmática	0,00	1,84

BP3262	TrpD	36 kDa	Antranilato fosforribosiltransferasa	Citoplasmática	8,46	13,42
BP3264	TrpE	55 kDa	Antranilato sintasa, componente I	Citoplasmática	11,66	18,10
BP3403	BP3403	33 kDa	UTP-glucosa-1-fosfatouridiltransferasa putativa	Citoplasmática	2,82	4,74
BP3420	BP3420	34 kDa	Serín/treonin deshidratasa	Citoplasmática	2,48	4,74
BP3471*	CoaD	19 kDa	Fosfopanteteina adeniltransferasa	Citoplasmática	7,13	11,65
BP3483	BP3483	29 kDa	Haloácido dehalogenasa similar a hidrolasa	Citoplasmática	1,07	3,99
BP3485*	ribH	18 kDa	Riboflavín sintasa, subunidad beta	Citoplasmática	3,88	10,79
BP3489*	BP3489	19 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	2,10	4,70
BP3529	BP3529	25 kDa	Hidroxilasa putativa	Citoplasmática	4,95	11,92
BP3537	ArgG	49 kDa	Argininosuccinato sintasa	Citoplasmática	16,92	23,59
BP3551*	AhpD	18 kDa	Proteína antioxidante putativa	Desconocida	7,86	12,67
BP3552	AhpC	20 kDa	Alquil hidroperóxido reductasa	Citoplasmática	23,80	36,80
BP3584*	BP3584	13 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	3,93	5,45
BP3642***	RpoA	36 kDa	RNA polimerasa DNA-dirigida, subunidad beta	Citoplasmática	39,23	48,31



BP3648	HemB	37 kDa	Acido delta-aminolevulínico deshidratasa	Citoplasmática	7,82	10,90
BP3649	EngB	23 kDa	Proteína de unión a GTP putativa	Desconocida	0,00	1,46
BP3659	BP3659	24 kDa	Glutation S-transferasa putativa	Membrana citoplasmática	0,34	1,84
BP3728	RkpK	48 kDa	UDP-glucosa 6-deshidrogenasa putativa	Desconocida	8,50	12,03
BP3730	GlmU	48 kDa	Proteína bifuncional de síntesis de UDP-N-acetilglucosamina	Citoplasmática	10,35	15,30
BP3752	BP3752	28 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	1,37	6,47
BP3767	HisG	24 kDa	ATP fosforribosiltransferasa	Citoplasmática	3,93	6,95
BP3828	BP3828	28 kDa	Proteína de unión a ATP del transportador ABC de aminoácidos putativa	Citoplasmática	2,48	9,44
BP3831	BP3831	37 kDa	Proteína de unión a aminoácido de transportador ABC putativa	Periplásmica	8,17	15,98
BP3838	BP3838	28 kDa	Proteína de la familia ubiE/COQ5 metiltransferasa	Citoplasmática	2,87	5,45
BP3857	BP3857	43 kDa	Hidrolasa putativa	Desconocida	1,07	2,86

\* Proteínas con peso molecular menor a 20 kDa

\*\* Proteínas con peso molecular mayor a 80 kDa

\*\*\* Proteínas previamente identificadas por nuestro grupo [9]

Tabla 2. Proteínas de *B. pertussis* cuyo nivel de expresión disminuye en limitación de hierro

N° ORF	Nombre	kDa	Descripción	Localización celular	Cuentas espectrales normalizadas SS	Cuentas espectrales normalizadas SS-Fe
BP0010*	RplK	15 kDa	Proteína ribosomal 50S, L11	Citoplasmática	6,02	3,95
BP0014*	RplL	13 kDa	Proteína ribosomal 50S, L7/L12	Citoplasmática	9,61	4,67
BP0015**	RpoB	153 kDa	RNA polimerasa DNA-dirigida, subunidad beta	Desconocida	30,73	19,97
BP0016**	RpoC	156 kDa	RNA polimerasa DNA-dirigida, subunidad beta'	Citoplasmática	58,72	37,95
BP0131	LeuA	63 kDa	2-isopropilmalato sintasa	Citoplasmática	60,42	36,52
BP0162	BP0162	35 kDa	Proteína hipotética	Membrana citoplasmática	7,87	4,33
BP0216**	SphB1	100 kDa	Autotransportador subtilisin-similar a proteasa	Desconocida	22,81	10,23
BP0246	AmiC	46 kDa	N-acetilmuramil-L-alanina amidasa	Citoplasmática	4,28	0,68
BP0258	BP0258	21 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	3,93	1,80
BP0273*	SspB	16 kDa	Proteína B de inanición rigurosa	Desconocida	1,41	0,00

BP0277	PetA	23 kDa	Ubiquinol-citocromo C reductasa, subunidad Fe-S	Membrana citoplasmática	4,27	2,55
BP0289	IlvD1	66 kDa	Dihidroxi-ácido deshidratasa 1	Citoplasmática	14,62	6,17
BP0369	BP0369	30 kDa	Endonucleasa putativa	Citoplasmática	5,34	1,43
BP0379	Ldh	37 kDa	L-lactato deshidrogenasa putativa	Citoplasmática	16,07	7,02
BP0385	BP0385	29 kDa	Proteína hipotética	Membrana citoplasmática	10,51	3,58
BP0428	BP0428	24 kDa	Regulador transcripcional de la familia GntR putativo	Citoplasmática	5,34	3,27
BP0454	BP0454	33 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	47,00	4,29
BP0475**	Rne	113 kDa	Ribonucleasa E	Citoplasmática	18,85	14,45
BP0489**	GyrB	90 kDa	DNA girasa, subunidad B	Citoplasmática	11,76	9,10
BP0491	DnaA	52 kDa	Proteína de iniciación de la replicación cromosomal, DnaA	Citoplasmática	1,75	0,34
BP0500	BP0500	69 kDa	Proteína hipotética	Membrana externa	4,52	0,00
BP0529**	BP0529	223 kDa	Autotransportador	Desconocida	3,93	1,47
BP0732	BP0732	46 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	2,14	0,00

BP0760**	CyaA	178 kDa	Hemolisín-adenilato ciclasa bifuncional	Extracelular	35,92	1,09
BP0789	IlyI	63 kDa	Acetolactato sintasa, subunidad mayor	Citoplasmática	9,19	2,86
BP0794*	RpsO	10 kDa	Proteína ribosomal 30S, S15	Citoplasmática	9,27	6,91
BP0824*	BP0824	16 kDa	Azurina	Periplásmica	5,30	1,46
BP0840	BP0840	41 kDa	Precursor de porina de membrana externa	Membrana externa	68,86	53,54
BP0847	NuoG	81 kDa	NADH deshidrogenasa, subunidad gamma	Citoplasmática	25,30	12,30
BP0975*	RplS	14 kDa	Proteína ribosomal 50S, L19	Citoplasmática	6,02	4,33
BP0989	PrlC	76 kDa	Oligopeptidasa A	Citoplasmática	14,18	5,39
BP1054**	Prn	93 kDa	Precursor de pertactina	Membrana externa	55,09	33,20
BP1077	FtsH	69 kDa	Proteína de división celular	Membrana citoplasmática	4,70	1,05
BP1119	Fim2	22 kDa	Subunidad fimbrial, serotipo 2	Extracelular/fimbrial	6,41	3,61
BP1144**	Tex	86 kDa	Proteína accesoria de la transcripción	Citoplasmática	4,18	0,34
BP1201	TcfA	66 kDa	Factor de colonización traqueal	Membrana externa	36,60	10,84
BP1245*	BP1245	19 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	5,00	3,27

BP1254**	PolA	99 kDa	DNA polimerasa I	Citoplasmática	2,52	0,00
BP1264	ParE	71 kDa	DNA topoisomerasa IV, subunidad B	Citoplasmática	11,02	4,12
BP1364	BP1364	28 kDa	Proteína periplásmica putativa de unión a aminoácido de transportador ABC de aminoácido	Periplásmica	24,08	6,88
BP1427**	BP1427	86 kDa	Probable antígeno de superficie	Membrana externa	29,41	23,91
BP1429	LpxD	38 kDa	UDP-3-O-[3-hidroxiimristoil]glucosamina N-acetiltransferasa	Citoplasmática	3,89	2,18
BP1436**	PpsA	86 kDa	Fosfoenolpiruvato sintasa	Citoplasmática	52,74	44,23
BP1440	BP1440	33 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	15,34	5,76
BP1481	LeuC	51 kDa	Isopropimalato isomerasa, subunidad mayor	Citoplasmática	10,26	2,93
BP1482	LeuD2	24 kDa	Isopropimalato isomerasa, subunidad menor	Citoplasmática	14,53	6,54
BP1497	ThrS	73 kDa	Treonil-tRNA sintetasa	Citoplasmática	10,97	3,95
BP1606	Fpr	29 kDa	Ferredoxin-NADP reductasa	Citoplasmática	3,55	0,68
BP1707	BP1707	28 kDa	Transportador ABC putativo, componente de unión a ATP	Membrana citoplasmática	5,29	0,00

BP1727*	BP1727	7 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	1,75	0,34
BP1732	PpiD	70 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa D	Membrana citoplasmática	17,05	5,80
BP1751	Dfp	42 kDa	Fosfopantotenoilcisteína sintasa/descarboxilasa	Citoplasmática	2,82	0,72
BP1759**	UvrD	84 kDa	DNA helicasaII	Citoplasmática	7,68	0,75
BP1776	ClpX	47 kDa	Subunidad de unión a ATP de proteasa dependiente de ATP	Citoplasmática	12,06	7,22
BP1777**	Lon	90 kDa	Proteasa La dependiente de ATP	Citoplasmática	35,41	12,20
BP1819	UgpB	48 kDa	Precursor de la proteína periplásmica de unión a glicerol-3-fosfato	Periplásmica	9,44	1,39
BP1879**	FhaB	368 kDa	Hemaglutinina filamentosa	Membrana externa	169,07	73,61
BP1881	FhaD	26 kDa	Chaperona	Periplásmica	6,36	3,23
BP1883	FhaE	39 kDa	Fimbria	Extracelular/fimbrial	3,50	0,00
BP1884	FhaC	64 kDa	Proteína activadora de hemolisina	Membrana externa	14,87	4,29
BP2014**	AcnA	98 kDa	Aconitato hidratasa	Citoplasmática	46,54	25,47
BP2021***	AcnB	93 kDa	Aconitato hidratasa	Citoplasmática	45,05	2,17

BP2044**	LeuS	99 kDa	Leucil-tRNA sintetasa	Citoplasmática	9,66	5,38
BP2050*	RpmG	6 kDa	Proteína ribosomal 50S, L33	Citoplasmática	2,82	0,38
BP2075	BP2075	48 kDa	Proteína de membrana interna de sistema de eflujo putativa	Membrana citoplasmática	9,91	3,31
BP2170	BP2170	24 kDa	Probable subunidad de citocromo C oxidasa	Desconocida	6,66	0,00
BP2191	BP2191	47 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	17,81	11,21
BP2199	IspG	47 kDa	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa	Citoplasmática	3,21	1,09
BP2233	BP2233	25 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	1,79	0,00
BP2315**	Vag8	95 kDa	Autotransportador	Membrana externa	18,46	12,00
BP2387*	BP2387	11 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	3,93	2,18
BP2396	BP2396	58 kDa	Posible proteína periplásmica perteneciente a sistema de transporte dependiente de proteína de unión	Periplásmica	25,18	6,85
BP2416	BP2416	35 kDa	Regulador transcripcional de la familia LysR putativo	Citoplasmática	3,16	0,34
BP2537	HemC	33 kDa	Porfobilinogeno deaminasa	Citoplasmática	10,60	5,01
BP2543**	MetE	84 kDa	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato	Citoplasmática	38,62	23,45

			homocisteín metiltransferasa			
BP2561	RdgC	34 kDa	Proteína asociada a la rcombinación	Citoplasmática	4,53	0,68
BP2572*	IhfA	12 kDa	Factor de integración al huésped, subunidad alfa	Citoplasmática	1,80	0,34
BP2573**	PheT	88 kDa	Fenilalanil-tRNA sintetasa, subunidad beta	Citoplasmática	7,47	3,28
BP2668**	PurL	145 kDa	Fosforibosilformilglicinamida sintasa	Citoplasmática	4,61	0,00
BP2753**	ClpA	84 kDa	Proteasa dependiente de ATP clp	Citoplasmática	9,87	2,19
BP2759	BP2759	41 kDa	Acetil-CoA acetiltransferasa	Citoplasmática	6,79	3,24
BP2761	SodB	21 kDa	Superóxido dismutasa [Fe]	Periplásmica	13,84	6,88
BP2793*	RplI	16 kDa	Proteína ribosomal 50S, L9	Citoplasmática	12,48	5,38
BP2818	BP2818	29 kDa	Proteína hipotética	Membrana citoplasmática	12,01	6,47
BP2864	BP2864	37 kDa	Alcohol deshidrogenasa putativa	Membrana citoplasmática	6,71	3,95
BP2889*	BP2889	16 kDa	Citocromo C' putativo	Periplásmica	5,34	0,38
BP2908	AroG	39 kDa	3-doexi-7-fosfoheptulonato sintasa	Citoplasmática	8,84	5,49



BP2915*	BP2915	13 kDa	Proteína hipotética	Periplásmica	1,07	0,00
BP2916*	BP2916	18 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	5,68	2,89
BP2924*	BP2924	10 kDa	Proteína hipotética	Periplásmica	3,16	1,09
BP2983**	NrdA	108 kDa	Ribonucleótido-difosfato reductasa, subunidad alfa	Citoplasmática	21,36	5,82
BP2984	NrdB	45 kDa	Ribonucleótido-difosfato reductasa, subunidad beta	Citoplasmática	6,45	1,80
BP3002	BP3002	69 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	1,07	0,00
BP3060	BP3060	76 kDa	Transglicosilasa putativa	Periplásmica	1,07	0,00
BP3084	BP3084	42 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	15,12	9,02
BP3085*	DksA	18 kDa	Proteína supresora de DnaK putativa	Citoplasmática	3,21	1,81
BP3121	BP3121	39 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	11,03	8,04
BP3213	GloB	29 kDa	Probable hidroxilglutathione hidrolasa	Citoplasmática	1,45	0,00
BP3226	GlnS	67 kDa	Glutamyl-tRNA sintetasa	Citoplasmática	10,00	4,37
BP3284*	AtpF	17 kDa	ATP sintasa, cadena B	Membrana citoplasmática	6,75	3,96
BP3322	BP3322	41 kDa	Posible proteína perteneciente a sistema de transporte dependiente de	Periplásmica	6,74	0,38

			proteína de unión			
BP3330	SurA	57 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa putativa	Periplásmica	20,60	10,97
BP3333	PykA	53 kDa	Piruvato kinasa	Citoplasmática	12,78	9,40
BP3402	BP3402	54 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	1,07	0,00
BP3405	OmpQ	39 kDa	Porina de membrana externa, OmpQ	Membrana externa	9,92	6,14
BP3432	CysI	65 kDa	Sulfito reductasa putativa	Citoplasmática	11,28	0,00
BP3494**	BrkA	103 kDa	Proteína de resistencia a suero	Membrana externa	63,97	35,94
BP3526**	Rnr	92 kDa	Ribonucleasa R putativa	Citoplasmática	2,82	0,68
BP3560	LigA	76 kDa	DNA ligasa	Citoplasmática	4,91	1,09
BP3614	RplD	23 kDa	Proteína ribosomal 50S, L4	Citoplasmática	18,16	13,49
BP3615*	RplW	11 kDa	Proteína ribosomal 50S, L23	Citoplasmática	9,96	7,60
BP3618*	RplV	12 kDa	Proteína ribosomal 50S, L22	Citoplasmática	5,34	3,27
BP3630*	RpsH	14 kDa	Proteína ribosomal 30S, S8	Citoplasmática	6,12	1,77
BP3631*	RplF	19 kDa	Proteína ribosomal 50S, L6	Citoplasmática	15,30	11,31
BP3635*	RplO	15 kDa	Proteína ribosomal 50S, L15	Citoplasmática	5,35	2,18

BP3650	BP3650	24 kDa	Precursor de citocromo C putativa	Periplásmica	3,93	2,18
BP3753**	GltB	173 kDa	Glutamato sintasa [NADPH], precursor de cadena larga	Membrana citoplasmática	17,89	1,50
BP3754	BP3754	54 kDa	Glutamato sintasa [NADPH], precursor de cadena corta	Citoplasmática	9,92	1,09
BP3755***	BP3755	23 kDa	Proteína de membrana externa putativa	Membrana externa	7,39	0,00
BP3760	BP3760	28 kDa	Lipoproteína putativa	Membrana externa	7,82	5,04
BP3761	BP3761	23 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	8,12	2,93
BP3783	PtxA	30 kDa	Precursor de toxina pertussis, subunidad 1	Extracelular	8,20	5,45
BP3793	PtlE	26 kDa	Sistema de secreción bacteriano putativo	Desconocida	3,55	0,00
BP3794	PtlF	29 kDa	Sistema de secreción bacteriano putativo	Desconocida	3,93	1,09
BP3796	PtlH	37 kDa	Sistema de secreción bacteriano putativo	Citoplasmática	1,07	0,00
BP3808	BP3808	33 kDa	Proteína hipotética	Citoplasmática	1,80	0,00
BP3823*	BP3823	7 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	2,82	0,34
BP3827	BP3827	35 kDa	Proteína hipotética	Desconocida	5,30	1,05

BP3852	KatA	55 kDa	Catalasa	Periplásmica	27,23	12,27
--------	------	--------	----------	--------------	-------	-------

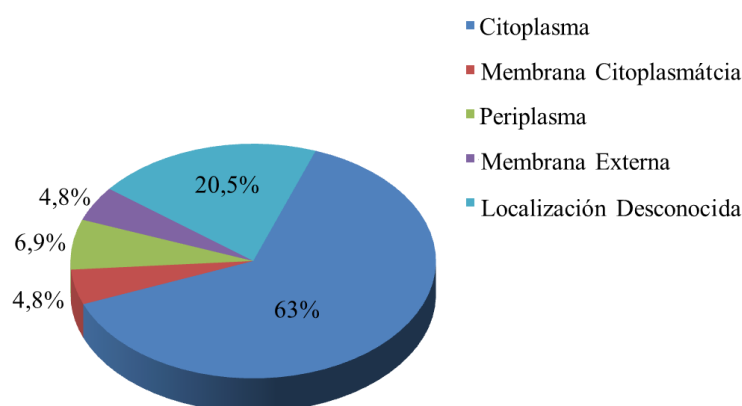
\* Proteínas con peso molecular menor a 20 kDa

\*\* Proteínas con peso molecular mayor a 80 kDa

\*\*\* Proteínas previamente identificadas por nuestro grupo [9]

### 3.2.2 Proteínas cuya expresión se induce en limitación de hierro

Se empleó el software PSORTb v3.0.2 para predecir la ubicación de las proteínas sobre-expresadas por *B. pertussis* bajo limitación de hierro (Tabla 1). La Figura 1 muestra la distribución de la localización subcelular de tales proteínas. Aquellas proteínas cuya localización no pudo ser predicha se incluyeron dentro de la categoría denominada “localización desconocida”.



**Figura 1. Localización de las proteínas sobre-expresadas bajo limitación de hierro.** La localización subcelular de las proteínas cuya expresión se vio aumentada bajo limitación de hierro fue predicha utilizando el software PSORTb.

La mayor parte de las proteínas sobre-expresadas se encuentran localizadas en el citoplasma (63%) y corresponden a proteínas involucradas en distintas rutas metabólicas que incluyen el ciclo del ácido cítrico, metabolismo de distintos aminoácidos y metabolismo de ácidos grasos. Entre las proteínas con probable localización periplásmica, es importante mencionar un conjunto de proteínas involucradas en la captura de hierro

(BP2463, BP1962, BP2016, BP0347, BP1605 y BP1152), como así también los componentes de unión a sustrato de un conjunto de transportadores tipo ABC de aminoácidos (BP1277, BP1575, BP1852, BP2743, BP2744, BP3828 y BP3831). Los componentes de unión a ATP de estos sistemas de transporte se ubican en el conjunto de proteínas con supuesta localización en membrana citoplasmática.

Entre las proteínas que presentaron un mayor nivel de expresión en limitación de hierro cabe mencionar aquellas proteínas relacionadas con la adquisición de este nutriente. Entre estas proteínas, se encuentran BhuV (BP0343), BhuS (BP0346) y BhuR (BP0347), todas ellas involucradas en la captura de hierro a partir de hemoproteínas [11]. Por otro lado, se encontraron varias proteínas relacionadas con la captura de hierro mediada por sideróforos con expresión aumentada, entre ellas dos proteínas involucradas en la biosíntesis del sideróforo tipo hidroxamato alcaligina, AlcB (BP2457) y AlcC (BP2458), y otras dos proteínas, denominadas ArgB (BP0383) y ArgC (BP2960) que participan en la síntesis de ornitina a partir de glutamato, el cual se encuentra en exceso estequiométrico en condiciones de limitación de hierro. La ornitina es el aminoácido precursor de alcaligina [12, 13], lo que podría explicar el aumento de expresión de proteínas involucradas en su síntesis. Junto con el aumento en la expresión de las proteínas involucradas en la síntesis de alcaligina se observó una mayor expresión del receptor de alcaligina férrica, FauA (BP 2463) [6]. Además, se detectó el aumento en la expresión dos posibles receptores de sideróforos, también identificados en la caracterización inicial del proteoma de *B. pertussis* limitada en hierro [9], denominados BfrI (BP1962) y BfrB (BP2016) [14], para los cuales aún se desconoce la fuente de hierro *in vivo*. Finalmente, IRP1-3 (BP1152) y AfuA (BP1605), dos proteínas con supuesta localización periplásmica previamente identificadas por nuestro grupo en el subproteoma de membrana externa [9], presentaron un aumento muy significativo en el nivel de expresión. Recientemente, se demostró que estas dos proteínas son necesarias para el transporte de hierro en dos entornos diferentes [15, 16]. AfuA media el transporte del nutriente a pH fisiológico [15], mientras que IRP1-3 lo hace a pH 6.[16]. Un aspecto particularmente interesante es que ambas proteínas son inmunogénicas y se expresan durante la infección, según resultados previos de nuestro grupo [9].

Por otro lado, particularmente interesante es el hallazgo de que la limitación de hierro induce la sobre-expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo, como son HslO (BP2379), AhpD (BP3551), AhpC (BP3552) y SodA (BP0193).

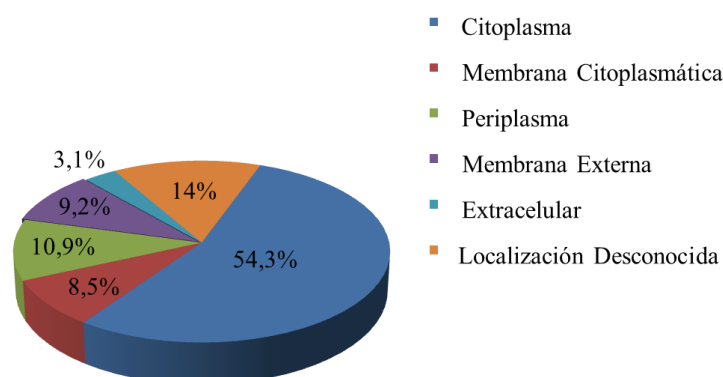
Otro aspecto interesante de este fenotipo es el aumento en la expresión de dos proteínas potencialmente relacionadas con la formación de biofilm, FumC (BP0248) y UDP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (BP3403), y dos proteínas relacionadas con el metabolismo de polisacáridos, RkpP (BP3728) y GlmU (BP3730). Resultados de estudios llevados a cabo en cultivos de biofilm de *B. pertussis* demostraron la presencia de sideróforos en los sobrenadantes de dichos cultivos, lo cual demuestra que la bacteria se encuentra limitada en hierro en esta forma de crecimiento. Por otro lado, se observó que la limitación de hierro induce la sobre-expresión de una proteína involucrada en biosíntesis de polisacárido capsular denominada wbpP (BP1630). Esto sugiere la posible expresión de cápsula cuando la bacteria se cultiva en ausencia de hierro, lo que podría conferirle ventajas en la evasión del sistema inmune del hospedador.

### 3.2.3 Proteínas que presentan menor nivel de expresión cuando *B. pertussis* se cultiva bajo limitación de hierro

La distribución de la localización subcelular de las distintas proteínas de *B. pertussis* que presentan menor nivel de expresión bajo limitación de hierro, según se determinó mediante el uso del software PSORTb, se muestra en la Figura 2. Al igual que lo que ocurre con las proteínas sobre-expresadas bajo limitación de hierro, el mayor porcentaje de proteínas (54,3%) se encuentran localizadas en el citoplasma y corresponde principalmente a proteínas implicadas en la replicación de DNA, transcripción de RNA y síntesis de proteínas, entre ellas proteínas de las subunidades ribosomales 50S y 30S, y distintas aminoacil-tRNA sintetasas.

Las variaciones más interesantes de las proteínas cuya expresión se reprime en limitación de hierro se encuentran en la fracción de proteínas de membrana externa y extracelulares representadas en la Figura 2. La mayor parte de estas proteínas están conformadas por los factores de virulencia regulados por el sistema de dos componentes BvgAS. Entre ellas, la principal adhesina FHA y la proteasa SphB1, responsable de la

liberación de FHA al medio extracelular. También se observó una disminución de la expresión de Fim, de la toxina PT y las proteínas que forman su sistema de secreción, la toxina CyaA, y otros factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS como son Vag8, BrkA, TcfA y Prn.



**Figura 2. Localización de las proteínas con menor expresión bajo limitación de hierro.** La localización subcelular de las proteínas cuya expresión se vio disminuida bajo limitación de hierro fue predicha utilizando PSORTb.

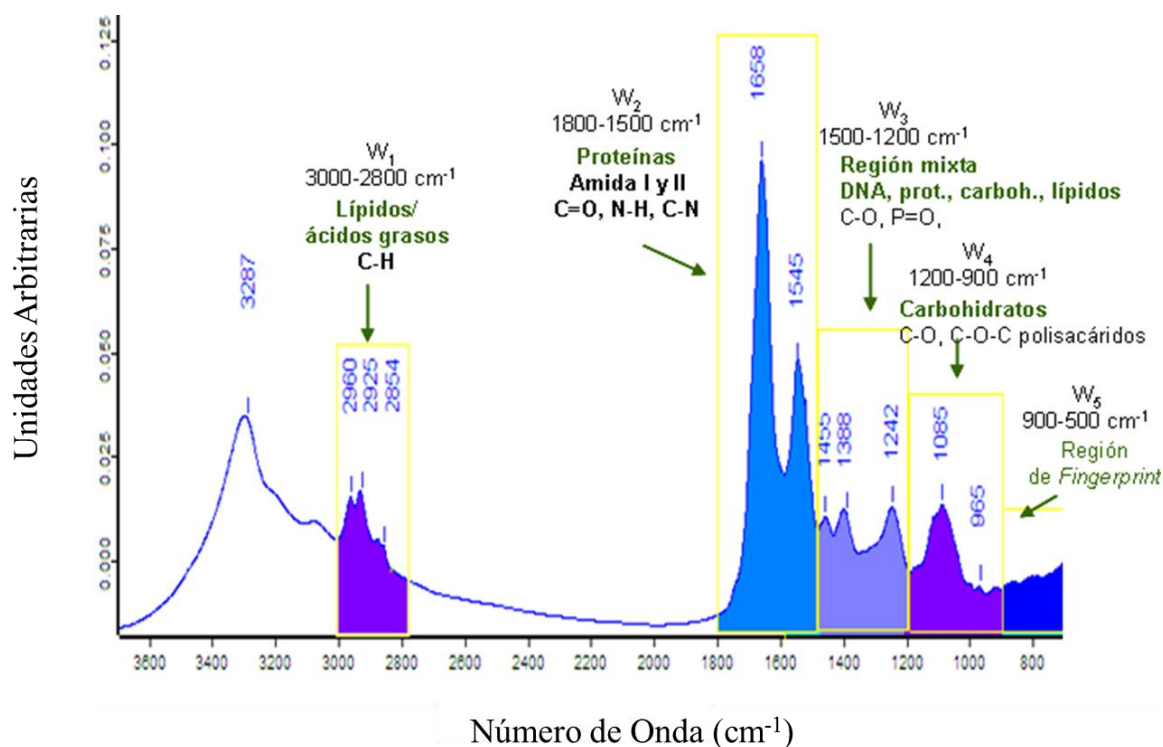
### 3.2.4 Análisis fenotípico de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro mediante espectroscopia FT-IR

Con el fin de evaluar cambios globales de la composición macromolecular inducidos por la limitación de hierro se empleó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. En particular nos interesaba detectar si había cambios apreciables en la producción de polisacáridos como lo sugerían los resultados de proteómica, consistente con el exceso estequiométrico de fuente de carbono. La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica fisicoquímica que puede aplicarse a la caracterización de la composición estructural y bioquímica de distintas muestras biológicas, entre ellas células microbianas [17, 18]. Los espectros IR bacterianos brindan información global sobre la naturaleza de las distintas macromoléculas que componen las células, tanto de los componentes intracelulares como de membranas o cubiertas celulares (lípidos,



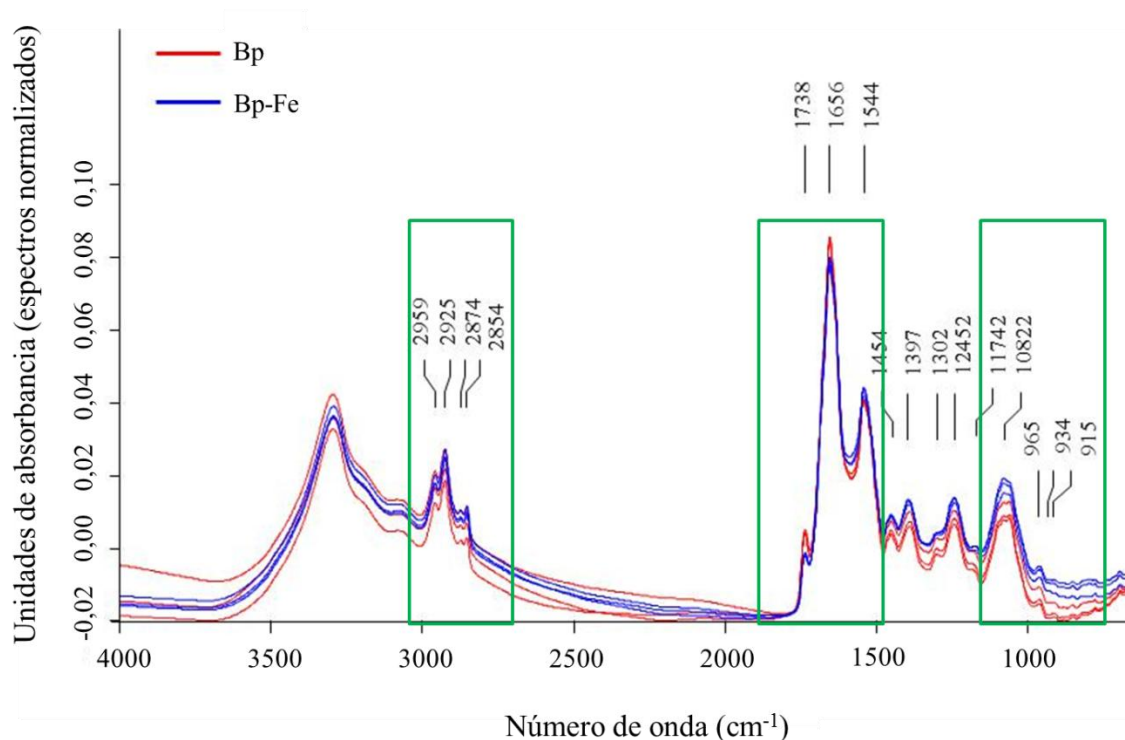
carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos) (Fig. 3) [18]. Esta metodología de estudio representa una estrategia analítica, sencilla y no destructiva que permite analizar la expresión fenotípica de una población [18, 19].

Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos se puede hacer una división de los mismos a fin de analizar lo que se denominan ventanas espectrales ( $W_i$ ). La Figura 3 muestra un espectro de una suspensión celular de *B. pertussis* deshidratada en el cual se indican las ventanas espectrales, las absorciones de los principales grupos funcionales y las correspondientes asignaciones a macromoléculas.



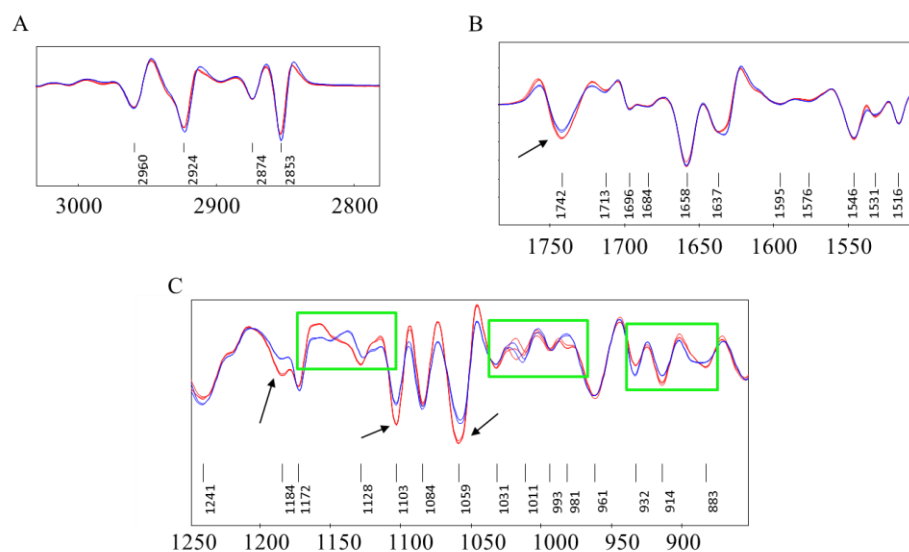
**Figura 3. Ejemplo de un espectro IR de células enteras de *B. pertussis*.** Las regiones espectrales destacadas en azul corresponden a las regiones donde aparecen las bandas de absorción de los grupos funcionales de las principales macromoléculas.

Los espectros IR obtenidos de bacterias cultivadas en condiciones estandarizadas son altamente específicos y reproducibles, por lo que es posible emplear esta metodología para comparar los fenotipos de poblaciones sometidas a diferentes entornos nutricionales. La Figura 4 muestra los espectros FT-IR obtenidos de células de *B. pertussis* cultivadas en exceso (espectros en rojo) y en limitación de hierro (espectros en azul) durante 24 hs.



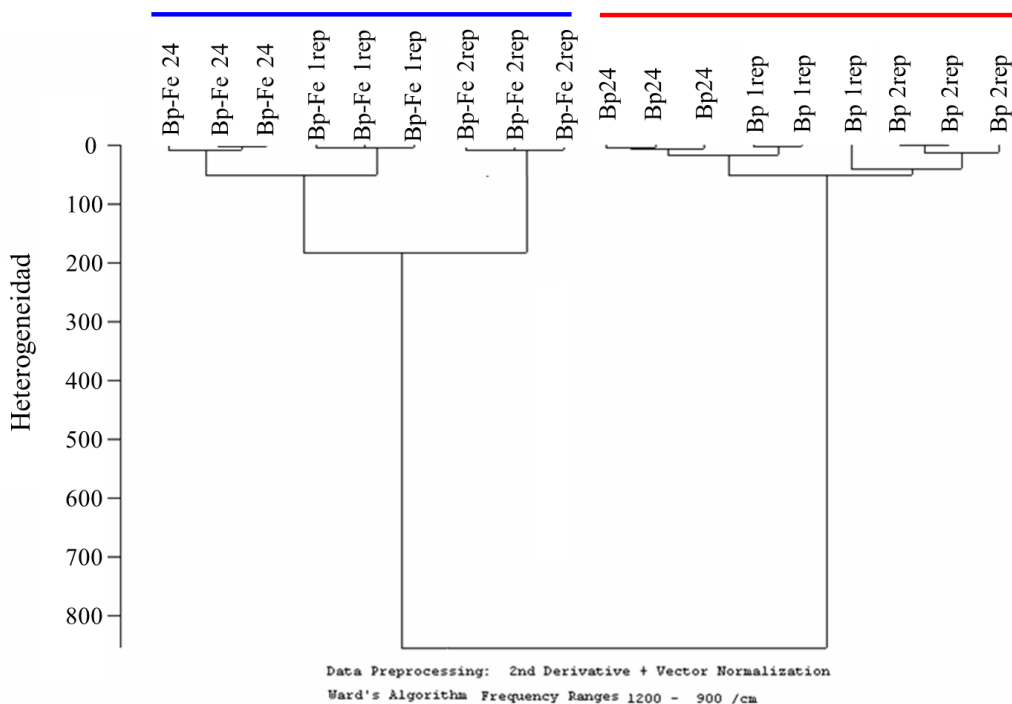
**Figura4. Espectros FT-IR de células de *B. pertussis* cultivada en exceso o limitación de hierro.** Espectros FT-IR correspondientes a cultivos de 24h en Erlenmeyer agitados (37 °C, 160 rpm) empleando medio de cultivo SS (espectros indicados en rojo) y SS-Fe (espectros indicados en azul). En los dos casos los replicados fueron obtenidos de suspensiones celulares recuperadas de 3 cultivos independientes. Las distintas ventanas espectrales analizadas se encuentran resaltadas en verde.

Si bien los espectros registrados bajo las distintas condiciones muestran una forma relativamente similar, pueden observarse algunas diferencias en la intensidad y en el número de onda para diferentes bandas, en las distintas ventanas espectrales (Fig. 4). Estas diferencias pueden visualizarse más claramente si se aplica sobre los espectros una de las técnicas de aumento de resolución, como lo es el análisis de sus derivadas segundas. La Figura 5 muestra las derivadas segundas de los espectros en las regiones correspondientes a las bandas de absorción de lípidos ( $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ), ésteres y proteínas ( $1780 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ ) e hidratos de carbono ( $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ ). El análisis en la región  $W_1$ , asignada a los estiramientos C-H de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  presentes en lípidos, muestra que los espectros obtenidos de cultivos limitados y no limitados en hierro no presentan diferencias significativas (Fig. 5A), lo que sugiere que la composición de los lípidos de membrana y/o la expresión de LPS no estarían afectados significativamente por dicha limitación. La derivada segunda correspondiente a la ventana espectral  $W_2$ , asignada al estiramiento del grupo C=O en ésteres, se muestra en la Figura 5B. En ella puede observarse que las muestras provenientes de bacterias cultivadas en exceso de hierro presentan un pico a  $1745 \text{ cm}^{-1}$  (señalado por una flecha negra en la Figura 5B) de mayor intensidad que el observado en las muestras provenientes de bacterias limitadas en hierro (Fig. 5B). Este pico constituye una marca distintiva de la presencia de polímeros de reserva energética como poli-hidroxibutirato (PHB). La acumulación celular de PHB puede confirmarse por la existencia de otros picos a  $1184$ ,  $1103$  y  $1059 \text{ cm}^{-1}$  asignados a este tipo de polímeros (señalados por flecha negras en la Fig. 5C). Las mayores diferencias en las derivadas segundas entre los cultivos limitados y no limitados en hierro se detectaron en la región asignada a la absorción de carbohidratos (resaltadas por recuadros verdes en la Fig. 5C). Si bien algunas de estas diferencias se deben a la absorción del PHB empleado como sustancia de reserva en las células cultivadas en exceso de hierro descrita anteriormente, existen otras diferencias que pueden apreciarse tanto en la intensidad del resto de los picos como en su posición, lo que indicaría modificaciones cuali y cuantitativas de los carbohidratos celulares.



**Figura 5. Derivadas segundas aplicadas a los espectros FT-IR de *B. pertussis* cultivada en exceso o limitación de hierro.** Las derivadas segundas de los espectros de *B. pertussis* cultivada en exceso (líneas rojas) o limitación (líneas azules) durante 24h fueron analizadas en las ventanas espectrales correspondientes a **A. Lípidos**, **B. Proteínas** y **C. Polisacáridos**.

Es interesante resaltar que al analizar muestras de cultivos limitados y no limitados en hierro luego de dos repiques consecutivos en los medios respectivos, las diferencias fenotípicas señaladas anteriormente se intensificaron. Las diferencias en el perfil metabólico de las bacterias cultivadas en exceso y en limitación de hierro resultaron significativamente diferentes. En particular, los cálculos de las distancias espectrales en la región de los carbohidratos ( $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ) y la posterior construcción de un dendograma, condujo a la discriminación de los espectros en dos grandes grupos: un cluster conteniendo todos los espectros provenientes de bacterias cultivadas en exceso de hierro y otro cluster conteniendo los espectros obtenidos de los cultivos limitados en hierro (Fig. 6). Esto significa que la mayor diferencia en la composición macromolecular entre las bacterias cultivadas bajo limitación y en exceso de hierro, se encuentra en la cantidad y calidad de polisacáridos producidos bajo cada condición.



**Figura 6. Dendrograma obtenido empleando las derivadas segundas de los espectros de *B. pertussis* cultivada en exceso o en limitación de hierro.** El dendrograma fue obtenido empleando las derivadas segundas de los espectros obtenidos a partir de células de *B. pertussis* cultivada en exceso (Bp) o en limitación de hierro (Bp-Fe) durante 24h (24), y luego del primer (1rep.) o el segundo (2rep.) repique. Las distancias espectrales fueron calculadas por el método de Pearson en la región asignadas a carbohidratos ( $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ) y el dendrograma fue construido empleando el algoritmo de Ward. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La combinación de los resultados obtenidos mediante proteómica y FT-IR señalan características del fenotipo expresado por *B. pertussis* en limitación de hierro que abren distintas líneas de investigación. De todas ellas, en este trabajo de Tesis se abordan dos aspectos en particular: el estudio del efecto que tienen los cambios fenotípicos observados,

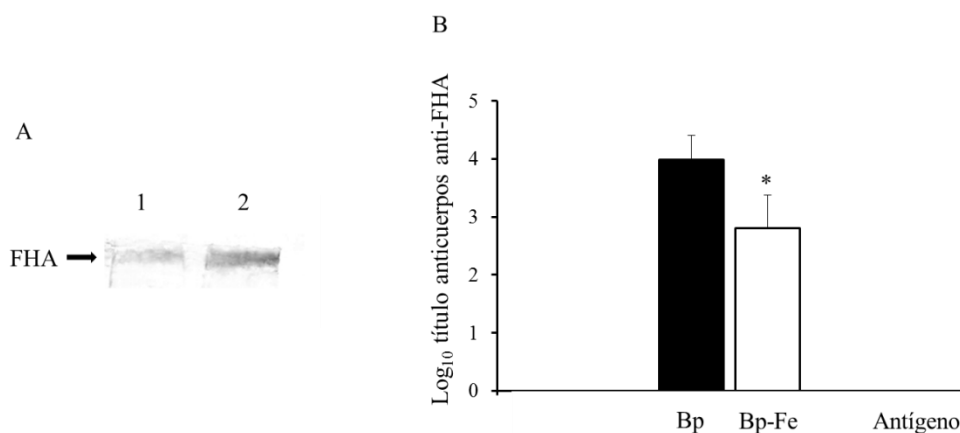
fundamentalmente a nivel de factores de virulencia, en la interacción innata de la bacteria con las células del sistema inmune del hospedador (este Capítulo); y la búsqueda de nuevos componentes vacunales entre las proteínas expresadas por este fenotipo (Capítulos 4 y 5).

### 3.2.5 Estudio de la interacción de *B. pertussis* limitada en hierro con células del sistema inmune del hospedador

Del análisis de las características del fenotipo de *B. pertussis* inducido por la limitación en hierro, la disminución de la expresión de los factores de virulencia resulta particularmente interesante debido a que podría afectar la interacción de la bacteria con el huésped. En particular, la disminución de la expresión de la principal adhesina, FHA, puede tener implicancia directa en la interacción con las células eucariotas. En ausencia de anticuerpos opsonizantes, las células del sistema inmune fagocitan *B. pertussis* principalmente a través del receptor de complemento 3 (CR3) al que se pega FHA [20, 21]. De esta forma, la disminución de la expresión de tal adhesina observada en la bacteria cultivada en ausencia de hierro podría conducir a una disminución en la fagocitosis mediada por CR3. Con el objetivo de evaluar esta posibilidad, se realizaron los siguientes ensayos.

En primer lugar, se realizaron ensayos de western blot para confirmar la disminución en la expresión de FHA. Con este objetivo, igual cantidad de proteínas provenientes de lisados celulares de *B. pertussis* cultivada en exceso y limitación de hierro fueron sometidos a ensayos de inmunodetección revelados con anticuerpos anti-FHA. Si bien ésta es una técnica semicuantitativa, en la Figura 7A se observa que, bajo limitación de hierro, la bacteria presenta una menor expresión de FHA detectable aún por esta metodología. Debido a que CR3 interacciona con la adhesina que se encuentra expuesta en la superficie bacteriana, se evaluó el nivel de expresión de FHA en superficie mediante ensayos de ELISA empleando como antígeno células enteras de *B. pertussis* cultivadas en limitación de hierro. Paralelamente, se realizaron los mismos ensayos utilizando como antígeno las bacterias enteras cultivadas en exceso de hierro, para ser empleadas como control. Se determinó el título para un mismo suero anti-FHA en cada condición ensayada.

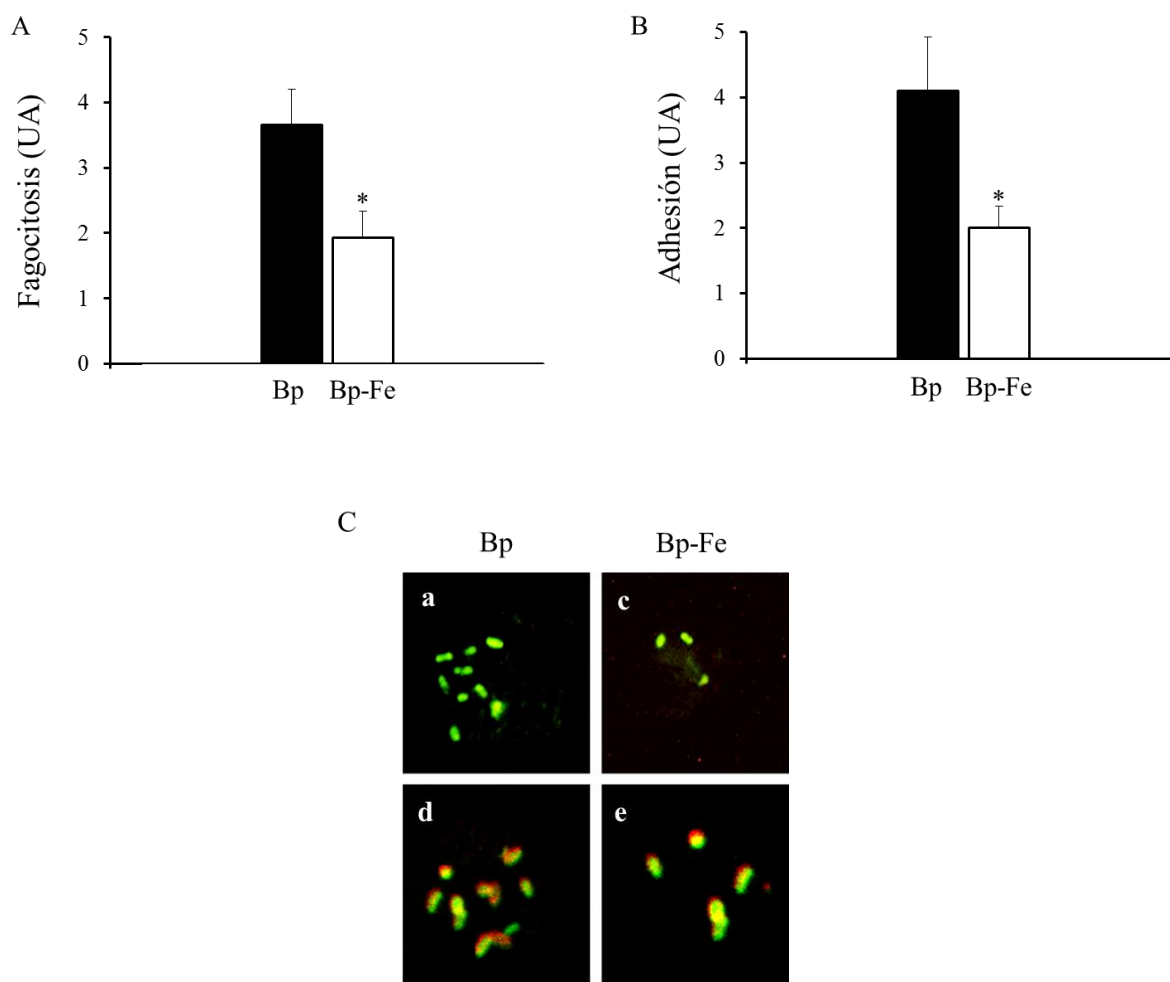
La menor expresión de FHA en superficie quedó reflejada en el menor título detectado en el caso de las células de bacterias limitadas en hierro ( $p<0,05$ ) (Fig. 7B).



**Figura 7. Efecto del estrés nutricional por limitación de hierro sobre la expresión de la adhesina FHA.** A. *B. pertussis* Tohama fue cultivada en ausencia (línea 1) o en exceso (línea 2) de hierro, las bacterias fueron lisadas y sometidas a ensayos de western blot utilizando anticuerpos anti-FHA. El título de sueros de ratones inmunizados con FHA (n=6) fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células enteras de *B. pertussis* cultivada en exceso (Bp) o ausencia de hierro (Bp-Fe). Los resultados muestran la media  $\pm$  DE. El título de anticuerpos anti-FHA en placas sensibilizadas con Bp-Fe difiere significativamente del observado en las placas sensibilizadas con Bp (\* $p<0,05$ ).

En vista de la disminución de FHA en superficie, evaluamos si la adaptación de la bacteria a la baja disponibilidad de hierro afectaba la interacción con neutrófilos humanos. Para ello se realizaron ensayos de fagocitosis con bacterias cultivadas en ausencia de hierro, utilizando como control bacterias cultivadas en exceso de este nutriente. La Figura 8A muestra que bajo limitación de hierro el número de bacterias fagocitadas es menor respecto del control ( $p<0,05$ ). Para evaluar si la disminución en el número de bacterias intracelulares era consecuencia de una menor adhesión de las mismas al neutrófilo, o a un efecto sobre la internalización de las bacterias, se realizaron los ensayos en presencia de citocalasina D, una droga que inhibe la fagocitosis. Los resultados, mostrados en la Figura 8B indican que la cantidad de bacterias asociadas neutrófilos continúa siendo menor cuando esta se

encuentra limitada en hierro ( $p < 0,05$ ), lo que demuestra que el proceso afectado en esta interacción es la adhesión a la célula, que trae aparejada la consecuente disminución en el número de bacterias intracelulares observada en los ensayos de fagocitosis.



**Figura 8. Efecto de la adaptación a la limitación de hierro en la interacción de *B. pertussis* con neutrófilos humanos.** PMN preincubados con A) PBS o B) citocalasina D por 15 minutos a 37°C, fueron incubados con GFP-*B. pertussis* cultivada en ausencia (Bp-Fe) o en exceso (Bp) de hierro durante 10 minutos a 37°C. Los neutrófilos fueron luego lavados para remover las bacterias no adheridas, y divididos en dos alícuotas. Una alícuota fue mantenida en hielo (nivel inicial de adhesión) mientras que la otra alícuota fue incubada durante 40 min a 37 °C para permitir que la internalización transcurra. Las bacterias unidas a la superficie fueron detectadas por incubación con



anticuerpo policlonal anti-*B. pertussis* de conejo seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con PE, lavados y analizados por citometría de flujo. **A.** La fagocitosis fue calculada como fluorescencia verde asociada a PMN debido a las bacterias fagocitadas. **B.** La adhesión se calculó a partir de la fluorescencia roja asociada a PMN. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La fagocitosis y adhesión de Bp-Fe difiere significativamente de la fagocitosis y adhesión de Bp (\* $p < 0.05$ ), respectivamente. UA: Unidades arbitrarias. **C.** Microscopía de fluorescencia de la fagocitosis (paneles a y c) y de la adhesión (paneles b y d) de bacterias de *B. pertussis* cultivadas en exceso (Bp) o en limitación (Bp-Fe) de hierro. En la figura se muestran fotos representativas de uno de cuatro experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar si además de la disminución en la expresión de FHA existe algún otro factor que participe en la disminución de la adhesión a neutrofilos observada en bacterias limitadas en hierro, se realizaron ensayos similares a los descritos anteriormente utilizando una cepa de *B. pertussis* defectiva en la expresión de FHA (BpGR4) cultivada en exceso y limitación de hierro. La ausencia total de FHA condujo a niveles de adhesión tan bajos, aún con niveles de multiplicidad de infección elevados, que impidió detectar la influencia de cualquier otro factor en la adhesión bacteriana.



### 3.3 Discusión

La escasez de hierro es un factor crítico para el desarrollo de la infección y en general afecta la patogenicidad de los microorganismos invasores. Diversos estudios demuestran que los patógenos de mamíferos logran superar esta limitación a través de la expresión de sistemas de alta afinidad de captura de este nutriente *in vivo*. *B. pertussis* no es la excepción, varios trabajos muestran que la bacteria se encuentra limitada en hierro dentro del hospedador [2, 22, 23], por lo que el estudio de este fenotipo bacteriano podría brindar información valiosa para comprender mejor la patogénesis bacteriana y la identificación de nuevos blancos de terapias preventivas. La primer caracterización del proteoma expresado por *B. pertussis* bajo estrés nutricional por baja disponibilidad de hierro fue realizada por nuestro grupo de trabajo mediante electroforesis bidimensional, identificándose 23 proteínas con expresión diferencial bajo estas condiciones de cultivo [9]. Con el objetivo de ampliar esta caracterización, en el presente trabajo continuamos con el estudio del proteoma de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro mediante proteómica *shotgun*, una técnica que presenta mayor sensibilidad. El empleo de esta metodología nos permitió obtener el proteoma completo de la bacteria adaptada tanto a la limitación como al exceso de, hierro, e identificar un número significativamente mayor de proteínas diferencialmente expresadas en cada condición.

El análisis del proteoma de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro mostró un menor nivel de expresión de un gran número de proteínas involucradas en la replicación de DNA y en la transcripción de RNA, como así también aquellas involucradas en la síntesis de proteínas. Esto sugiere que bajo limitación de hierro se encuentra disminuida la duplicación celular, lo que es consistente con la menor biomasa alcanzada cuando la bacteria se cultiva en estas condiciones respecto de la obtenida cuando la bacteria se encuentra en exceso de hierro a los mismos tiempos de cultivo. A pesar de esta disminución en la velocidad de la duplicación, el análisis del proteoma de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro mostró un aumento en el nivel de expresión de distintos transportadores tipo ABC de aminoácidos, los cuales se encuentran en exceso estequiométrico en estas condiciones de cultivo, como así también de enzimas involucradas

en su metabolismo. Estos resultados sugieren que, bajo limitación de hierro, la bacteria continúa adquiriendo nutrientes, probablemente destinados al mantenimiento celular.

El estrés oxidativo y el metabolismo del hierro frecuentemente se encuentran relacionados. El hierro, en su estado soluble reducido ( $\text{Fe}^{+2}$ ) resulta tóxico; y su oxidación a  $\text{Fe}^{+3}$  conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno, peligrosas para la célula. Como se mencionó anteriormente, en respuesta a ambientes con baja disponibilidad de hierro los microorganismos expresan distintos sistemas de captura de alta afinidad por este nutriente. Como consecuencia, la concentración de hierro intracelular puede aumentar transitoriamente a pesar de su baja concentración extracelular, conduciendo a un aumento en el nivel de especies reactivas de oxígeno. En *Campylobacter jejuni*, la expresión de la proteína AhpC inducida bajo limitación de hierro parece contrarrestar el efecto de la acumulación intracelular del metal debido a la activación de distintos sistemas de captura inducidos en estas condiciones [24]. Según nuestros resultados algo similar ocurre en el caso de *B. pertussis*. El análisis del proteoma de esta bacteria cultivada bajo limitación de hierro mostró que en estas condiciones se induce la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo, entre ellas AhpC (BP3552) y AhpD (BP3551), ésta última necesaria para la activación de la enzima AhpC. Asimismo, se observa que también se induce la expresión de SodA (BP0193), que confiere resistencia a las especies reactivas del oxígeno, y HslO (BP2379), una proteína que funciona como chaperona bajo condiciones oxidantes, uniéndose a las proteínas con daño oxidativo protegiéndolas así del agregado irreversible. La sobre-expresión de estas proteínas podría además conferirle a este patógeno ventajas durante la infección. La fagocitosis de *B. pertussis* por células del sistema inmune del hospedador en ausencia de anticuerpos opsonizantes conduce a la evasión del tráfico a lisosomas de una proporción de las bacterias fagocitadas [25, 26] y a la sobrevida de las mismas dentro de fagosomas. En el caso de macrófagos hemos observado que *B. pertussis* es incluso capaz de replicar dentro de estas estructuras [26]. De cualquier manera, una proporción significativa de bacterias son transportadas a lisosomas e inactivadas dentro de las 24 horas del encuentro con la célula inmune. La sobre-expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo inducidas en condiciones fisiológicas podría aumentar las chances de sobrevida de las bacterias fagocitadas, favoreciendo el establecimiento de nichos de persistencia

La caracterización previa del proteoma de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro permitió la identificación de ciertas proteínas inducidas en esta condición involucradas en la adquisición de este nutriente [9], entre las que se halla una proteína denominada BhuS (BP0346). Esta proteína forma parte de un sistema denominado Bhu (de *Bordetella heme utilization*) presente en *B. pertussis* y en *B. bronchiseptica* que es necesario para la adquisición de hierro a partir de hemoproteínas [11]. En el presente trabajo, además de la inducción de la expresión de BhuS, se observó por primera vez la expresión de la proteína putativa BhuV, la cual forma parte del mismo cluster, denominado *bhuRSTUV*, y que, en base a homología con otros sistemas de captura de hemoproteínas, funcionaría como una ATPasa necesaria para el transporte del grupo hemo a través de la membrana citoplasmática [11]. También demostramos la inducción de la expresión del receptor de grupo hemo BhuR. Existen estudios que sugieren que este sistema de captura de hemoproteínas cumple un rol durante la infección de *B. pertussis* y que su expresión sería necesaria en los estadios más avanzados de la infección [2, 23]. Como ya se mencionó, durante la colonización inicial del epitelio, la principal fuente de hierro es la lactoferrina. Así, en las etapas iniciales de la infección, *B. pertussis* extraería el hierro de esta glicoproteína a través de sideróforos. A medida que la infección avanza, los efectos de distintas toxinas de *B. pertussis* conducen a la lisis de células del huésped, permitiendo el acceso a nuevas fuentes de hierro como transferrina y hemoproteínas, cobrando importancia el sistema de adquisición de hierro BhuRSTUV [23]. Si bien BhuR es un receptor cuya expresión se induce por la presencia de sustrato, en limitación de hierro existe una expresión basal del sistema BhuRSTUV debido a la liberación de la represión mediada por la proteína Fur [27], por lo que el aumento en la expresión observado en este estudio podría ser consecuencia de dicho mecanismo. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que la expresión en nuestro sistema de cultivo se deba a la presencia de hemo en el medio probablemente arrastrado desde el cultivo en medio sólido que contiene sangre de carnero.

Por otro lado, en este estudio, se detectó la sobre-expresión de un conjunto de proteínas relacionadas con la alcaligina, un sideróforo expresado por *B. pertussis* en condiciones fisiológicas y del que depende en gran medida la captura de hierro dentro del hospedador [28]. Los genes que codifican para la biosíntesis de este sideróforo y su regulación se encuentran agrupados en el operón *alcABCDER* [12, 29-32]. La expresión de

este operón se encuentra reprimida por Fur y por la presencia de hierro [12, 33]. La bacteria recupera la alcaligina cargada con hierro (alcaligina férrica) a través del receptor de membrana dependiente de TonB, FauA [6]. De acuerdo con la de-represión del sistema en ausencia de hierro [12], en este estudio se encontró que la síntesis de las proteínas AlcB (BP2457) y AlcC (BP2458) involucradas en la biosíntesis de alcaligina, y que la síntesis del receptor de alcaligina férrica, FauA (BP2463), se encuentra fuertemente inducida en *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro. Acorde al aumento en la biosíntesis de alcaligina, se observó un mayor nivel de expresión de dos proteínas involucradas en la síntesis de ornitina, ArgB (BP0383) y ArgC (BP2960), el aminoácido precursor de alcaligina [12]. Además de estas proteínas de función conocida relacionadas con la captura de hierro dependiente de sideróforos, se identificaron otros dos potenciales receptores de sideróforos, BfrI (BP1962), previamente identificado mediante 2-DE [9], y BfrB (BP2016), que es homólogo del receptor del sideróforo tipo hidroxamato de *Yersinia enterocolitica*, ferricromo, y que fue identificado en *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* [14]. También relacionadas con la captura de hierro de alta afinidad se observó un aumento de la expresión de IRP1-3 (BP1152) y AfuA (BP1605), resultado que también había sido demostrado por nuestro grupo previamente [9]. Estudios posteriores a la publicación del proteoma diferencial de *B. pertussis* en limitación de hierro que nuestro grupo hizo efectivo en el año 2007 [9], demostraron que estas dos proteínas, originalmente anotadas como hipotéticas, tienen roles importantes en la adquisición de hierro durante la infección [15, 16]. Ese hallazgo, conjuntamente con resultados nuestros que indican que ambas se expresan *in vivo* y que son inmunogénicas [9], señala a estas proteínas como potenciales candidatos vacunales.

Estudios previos, en otras especies bacterianas, sugieren que la disponibilidad de hierro está involucrada en la formación de biofilm. En algunas especies, tales como *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* se ha demostrado que la limitación en hierro favorece esta forma de crecimiento [34-36]. Por el contrario, la limitación en este nutriente inhibe la formación de biofilm en otras especies como por ejemplo *Vibrio cholerae* [37]. El proteoma de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro mostró una sobre-expresión de dos proteínas homólogas a proteínas involucradas en la formación de biofilm en otras bacterias, FumC (BP0248) y UDP-glucosa-1-fosfato

uridiltransferasa (BP3403). FumC es una proteína previamente identificada por nuestro grupo sobre-expresada bajo limitación de hierro [9] que está involucrada en la formación de biofilm en otros patógenos [38]. La otra proteína identificada en este trabajo, UDP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, potencialmente involucrada en el metabolismo de hidratos de carbono, presenta homología con GtaB, una proteína presente en *Bacillus subtilis* implicada en la formación de biofilm [39]. Estos resultados permiten especular que condiciones fisiológicas, como es el estrés nutricional por limitación en hierro, podrían favorecer la formación de biofilm, lo que le permitiría a la bacteria persistir dentro del hospedador. Existen trabajos que demuestran que la biosíntesis de polímeros de carbohidratos en *Bordetella* se encuentra estrechamente relacionada con la formación de biofilm [40, 41]. El aumento en la expresión de ciertas proteínas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos en limitación de hierro parece apoyar esta hipótesis. También en este sentido, el estudio macromolecular comparativo entre el fenotipo de *B. pertussis* limitado en hierro y el expresado por la bacteria cultivada en exceso del nutriente mediante FT-IR, señala un aumento en la producción de carbohidratos cuando la bacteria se encuentra limitada en hierro. Este estudio también mostró que *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro presenta una menor producción de polialcanoatos de reserva, como por ejemplo poli-hidroxi-butirato, lo que sugiere que el exceso de fuente de carbono y energía podría ser destinado a la formación de otros componentes, como por ejemplo polisacáridos. El aumento en la síntesis de polisacáridos bajo estas condiciones de cultivo, podría estar relacionado también con la formación de cápsula. Si bien la producción de cápsula en *B. pertussis* aún se encuentra en discusión, el análisis del genoma de este patógeno reveló la presencia de un locus organizado en un operón que comprende genes involucrados en la biosíntesis, transporte y exportación/modificación de un probable polisacárido capsular [8]. Aquellos genes que podrían estar involucrados en la biosíntesis de cápsula presentan homología con las enzimas encargadas de la biosíntesis del antígeno Vi de *Salmonella typhi*, lo que sugiere que el producto del locus de *B. pertussis* puede ser similar al polímero de ácido N-acetilgalacturónico presente en dicho antígeno [8]. Estudios recientes sugieren la presencia de una microcápsula en la superficie de *B. pertussis*, cuya expresión podría aumentar en fase avirulenta [42]. En este estudio observamos que *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro sobre-expresa una proteína involucrada en la biosíntesis de

polisacárido capsular (BP1630). La desregulación de las vías de utilización de la fuente de carbono en bacterias creciendo en exceso estequiométrico de este nutriente es algo bastante común en bacterias y particularmente relevante en patógenos ya que generalmente determina excreción de polisacáridos en forma de cápsula o matriz extra-citoplasmática que les brinda protección contra las defensas del huésped. Nuestros resultados parecen sugerir un comportamiento similar en el caso de *B. pertussis*. Al momento de la escritura de esta tesis se están llevando a cabo estudios que permitan esclarecer este aspecto y evaluar su impacto en la patogénesis de esta bacteria.

El estudio comparativo mediante FT-IR no mostró diferencias en las bandas de absorción correspondientes a lípidos. Esto parecería sugerir que la composición de los lípidos de membrana de *B. pertussis* y/o la expresión de LPS no se ven afectadas por el estrés nutricional por limitación en hierro.

Como se describió en el Capítulo 1 de este Trabajo de Tesis, *B. pertussis* expresa una variedad de factores de virulencia que se encuentran regulados por el sistema de dos componentes BvgAS compuesto por un sensor de condiciones ambientales anclado a la membrana, BvgS, y un regulador transcripcional, BvgA. Si bien se han descrito distintos reguladores para este sistema, como por ejemplo  $MgSO_4$  y ácido nicotínico, de lo que se conoce hasta el momento el único modulador de la virulencia que podría tener algún rol *in vivo* es la temperatura. Los resultados obtenidos en este Capítulo, parecen indicar que el nivel de hierro podría ser otro regulador. El estrés nutricional inducido por la falta de hierro disminuye el nivel de expresión de todos los factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS conocidos (Tabla 2), sugiriendo que la baja disponibilidad de hierro tiene un efecto directo sobre el sistema BvgAS. Sin embargo, no puede descartarse que la limitación en hierro influya sobre la expresión de los factores de virulencia en una forma independiente del sistema BvgAS. Por ejemplo, se ha observado que una cepa mutante de *B. pertussis* que expresa el sistema BvgAS de forma constitutiva, presenta un menor nivel de transcripción de distintos genes regulados por este sistema en respuesta a condiciones de entorno [43], lo que sugiere que existen otro/s sistema/s regulatorio/s que podrían controlar la expresión de los factores de virulencia en forma coordinada con el sistema BvgAS. En este sentido se observó una variación del nivel de expresión de dos factores de transcripción que podría



tener un rol en la modificación del perfil de expresión de los factores de virulencia. Por un lado, la limitación en hierro conduce a un aumento en el nivel de expresión de un regulador transcripcional perteneciente a la familia TetR (BP1202). Los miembros de esta familia son represores transcripcionales que regulan la expresión de distintos tipos de genes en una gran variedad de bacterias, entre los que se encuentran genes relacionados con la virulencia [44]. El otro regulador de la transcripción identificado con potencial importancia en la regulación de la virulencia es BP2416. Esta proteína, la cual presenta un menor nivel de expresión cuando *B. pertussis* se cultiva bajo limitación en hierro, pertenece a la familia LysR de reguladores transcripcionales, que regulan genes involucrados en virulencia, metabolismo, quorum sensing y movilidad [45]. En particular, los reguladores PhcA y SpvR pertenecientes a esta familia activan la expresión de genes involucrados en la virulencia de *Pseudomonas solanacearum* [46] y *Salmonella* spp. [47] respectivamente. Podría especularse que BP2416 actúe en el mismo sentido en *B. pertussis*, por lo que su menor expresión traería aparejado un menor nivel de expresión de distintos factores de virulencia. Así, estos dos reguladores, podrían modificar los niveles de expresión de los factores de virulencia en una forma independiente del sistema BvgAS.

Entre los factores de virulencia que presentaron una disminución significativa en su expresión en respuesta a la falta de hierro, se encuentra la proteína hemaglutinina filamentosa, FHA. Esta proteína se sintetiza como un precursor, FhaB (BP1879), que luego de sufrir varias modificaciones genera la proteína madura FHA, que es transportada y secretada a través de la membrana con ayuda de la proteína FhaC (BP1884) [48]. Parte de FHA unida a membrana es liberada al medio extracelular por acción de la proteasa SphB1 (BP0216). La expresión de todas estas proteínas se encuentra regulada por el sistema BvgAS. Tanto FhaB, FhaC, como SphB1 mostraron un nivel de expresión significativamente menor en *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro. Dado que FHA es la principal adhesina conocida de este patógeno [49, 50], la disminución en su nivel de expresión podría indicar que en estas condiciones la bacteria presenta una menor capacidad de unión a las células del huésped. Sin embargo, en el caso del epitelio respiratorio, resultados previos de nuestro grupo demuestran que bacterias cultivadas en limitación de hierro tienen un mayor nivel de adhesión a dichas células, pero este aumento demostró ser independiente de FHA [51], lo que sugiere que bajo limitación de hierro, *B.*

*pertussis* expresa otras adhesinas distintas de FHA que podrían contribuir a la colonización del epitelio. Estudios tendientes a identificar esas adhesinas están actualmente en marcha fundamentalmente porque según pudimos observar estas adhesinas son inmunogénicas e inducen anticuerpos que interfieren con la adhesión de la bacteriana al epitelio [51]. Un aspecto particularmente importante es que estos anticuerpos están presentes en sueros de individuos infectados pero no de vacunados, lo cual sugiere que estas adhesinas se inducen *in vivo*. Por otra parte, FHA también se encuentra involucrada en la interacción con células del sistema inmune innato del hospedador (PMN y macrófagos) a través del receptor de complemento 3 (CR3), que constituye su molécula blanco en estos tipos celulares [20, 21, 52]. Ensayos realizados en este estudio señalan que la disminución de la expresión de FHA en la superficie bacteriana cuando *B. pertussis* se encuentra bajo stress nutricional por escasez de hierro conduce a un menor nivel de adhesión de la bacteria a PMN, contribuyendo así a una disminución en la captura de la bacteria y favoreciendo la inmunoevasión bacteriana en huéspedes no inmunes. En conclusión, esta disminución en la expresión de la principal adhesina inducida en limitación de hierro y, por tanto, probablemente inducida *in vivo*, podría resultar ventajosa para la bacteria durante la infección ya que parecería disminuir la adhesión de la bacteria a neutrófilos sin perjudicar la adhesión a epitelio (primer paso de la colonización), la cual se ve compensada por la expresión de otras adhesinas inducida bajo esta condición de estrés nutricional.

Otro factor de virulencia que mostró una disminución significativa en los niveles de expresión bajo limitación en hierro es Fimbria. Como se describió anteriormente, existen dos serotipos de subunidad mayor de fimbria, Fim2 y Fim3 que comparten una subunidad menor común, FimD. Como se muestra en la Tabla 2, cuando se cultiva bajo limitación de hierro *B. pertussis* presenta un menor nivel de expresión de Fim2 (BP1119) y de FimD (BP1883). Este resultado es particularmente interesante y podría contribuir a la inmunoevasión promovida por la disminución de FHA ya que distintos estudios sugieren que FimD participa también en la adhesión a monocitos provocando un aumento en la expresión de CR3, promoviendo de esta forma la interacción con FHA [53, 54]. Por otra parte, Fimbria es el blanco de aglutininas más importante de esta bacteria. Según estudios previos de nuestro grupo [55] la inhibición de la adhesión a epitelio en individuos vacunados depende críticamente de anticuerpos contra fimbria y no contra FHA. Esto es

debido a que dicha protección depende fundamentalmente de la actividad aglutinante de los anticuerpos anti-Fim y no del bloqueo de epitopes adhesivos en FHA. La aglutinación de las bacterias inhibe su interacción con el epitelio. En este contexto la disminución de la expresión de Fim *in vivo* en respuesta a la baja disponibilidad de hierro podría favorecer la colonización de huéspedes no inmunes e inmunes.

Otros factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS también presentan una disminución en el nivel de expresión, entre ellos las toxinas PT y ACT, así como también los autotransportadores Prn, BrkA, Vag8 y TcfA. Todos estos factores están implicados en procesos inflamatorios, por lo que es fácil imaginar que una disminución en su expresión favorecerá la persistencia de la bacteria en el hospedador. Sin embargo, la importancia potencial de este hallazgo amerita un estudio más profundo que permita evaluar las implicancias *in vivo* de ésta disminución en la expresión de factores de virulencia, así como los mecanismos de regulación involucrados. Por último, cabe destacar que si el fenotipo observado *in vitro* refleja el que presenta la bacteria *in vivo*, la atenuación de la virulencia observada podría tener implicancias en la capacidad de protección de las vacunas acelulares actuales, formuladas con distintas combinaciones de los factores de virulencia PT, FHA, Prn y Fim2 y Fim3, que deberán tenerse en cuenta al momento de estudiar nuevas formulaciones vacunales.



### 3.3 Conclusiones

En el presente Capítulo se amplió la caracterización del proteoma de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro previamente realizada por nuestro grupo de trabajo [9]. Las observaciones más importantes en lo que refiere al avance logrado con el empleo de esta nueva estrategia de ómica se detallan a continuación.

Los resultados muestran que, bajo limitación de hierro, este patógeno expresa un conjunto de sistemas de captura para este nutriente, algunos no identificados previamente.

La limitación de hierro induce la expresión de proteínas implicadas en la biosíntesis de polisacáridos, potencialmente relacionados con la formación de cápsula y de biofilm, lo que podría contribuir a la evasión de las defensas del huésped y a la persistencia en el mismo.

El fenotipo inducido por limitación de hierro presenta una disminución de la expresión de la gran mayoría de los factores de virulencia regulados por el sistema de dos componentes BvgAS, lo que podría afectar el nivel de protección conferido por las vacunas acelulares, compuestas por distintas combinaciones de dichos factores de virulencia purificados.

El menor nivel de expresión bajo limitación de hierro de la adhesina FHA conduce a una disminución en la adhesión a células inmunes contribuyendo así a una disminución en la captura de la bacteria y favoreciendo la inmunoevasión bacteriana en huéspedes no inmunes.

Debido a que la inhibición de la adhesión a epitelio en individuos vacunados depende críticamente de anticuerpos contra fimbria, la menor expresión de este antígeno bajo limitación de hierro podría favorecer la colonización en huéspedes inmunes.

La sobre-expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo podría representar una ventaja para la supervivencia de la bacteria tanto en individuos inmunes como no inmunes.



## Referencias

- [1] Mahan MJ, Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA. Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. *Annu Rev Genet* 2000;34:139-64.
- [2] Brickman TJ, Hanawa T, Anderson MT, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol* 2008;70(1):3-14. Epub 2008 Jun 28.
- [3] Brickman TJ, Anderson MT, Armstrong SK. *Bordetella* iron transport and virulence. *Biomaterials* 2007;20(3-4):303-22. Epub 2007 Feb 13.
- [4] Redhead K, Hill T, Chart H. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 1987;133(4):891-8.
- [5] Menozzi FD, Gantiez C, Locht C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1991;59(11):3982-8.
- [6] Brickman TJ, Armstrong SK. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol* 1999;181(19):5958-66.
- [7] Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 2000 Oct;182(20):5902-5.
- [8] Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 2003 Sep;35(1):32-40.
- [9] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [10] Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1999 Jul;17(7):676-82.
- [11] Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* bhu locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol* 2001;183(14):4278-87.
- [12] Kang HY, Brickman TJ, Beaumont FC, Armstrong SK. Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1996 Aug;178(16):4877-84.
- [13] Brickman TJ, Armstrong SK. The ornithine decarboxylase gene *odc* is required for alcaligin siderophore biosynthesis in *Bordetella* spp.: putrescine is a precursor of alcaligin. *J Bacteriol* 1996 Jan;178(1):54-60.

- [14] Beall B. Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *Res Microbiol* 1998 Mar;149(3):189-201.
- [15] Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol* 2011 Jul 8.
- [16] Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol* 2012 Aug 24.
- [17] Moreno J, Vargas MA, Madieto JM, Munoz J, Rivas J, Guerrero MG. Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnol Bioeng* 2000 Feb 5;67(3):283-90.
- [18] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 1991 May 2;351(6321):81-2.
- [19] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003 Jan;41(1):324-9.
- [20] Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* 1990 Jun 29;61(7):1375-82.
- [21] Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 1994 Oct 1;180(4):1225-33.
- [22] Brickman TJ, Armstrong SK. Impact of alcaligin siderophore utilization on in vivo growth of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2007;75(11):5305-12. Epub 2007 Aug 27.
- [23] Brickman TJ, Vanderpool CK, Armstrong SK. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun* 2006;74(3):1741-4.
- [24] Baillon ML, van Vliet AH, Ketley JM, Constantinidou C, Penn CW. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 1999 Aug;181(16):4798-804.
- [25] Lamberti Y, Perez Vidakovich ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* 2008;44(6):501-11. Epub 2008 Jan 9.
- [26] Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovich ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 2010 Mar;78(3):907-13.



- [27] Vanderpool CK, Armstrong SK. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol* 2004 Feb;186(4):938-48.
- [28] Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1995;177(4):1116-8.
- [29] Giardina PC, Foster LA, Toth SI, Roe BA, Dyer DW. Identification of *alcA*, a *Bordetella bronchiseptica* gene necessary for alcaligin production. *Gene* 1995 Dec 29;167(1-2):133-6.
- [30] Giardina PC, Foster LA, Toth SI, Roe BA, Dyer DW. Analysis of the *alcABC* operon encoding alcaligin biosynthesis enzymes in *Bordetella bronchiseptica*. *Gene* 1997 Jul 18;194(1):19-24.
- [31] Beaumont FC, Kang HY, Brickman TJ, Armstrong SK. Identification and characterization of *alcR*, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1998;180(4):862-70.
- [32] Pradel E, Guiso N, Locht C. Identification of *AlcR*, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1998 Feb;180(4):871-80.
- [33] Brickman TJ, Armstrong SK. *Bordetella pertussis* *fur* gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bordetella bronchiseptica* mutants. *J Bacteriol* 1995;177(1):268-70.
- [34] Hindre T, Bruggemann H, Buchrieser C, Hechard Y. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* 2008;154(Pt 1):30-41.
- [35] Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Petrucca A, Antonini G, et al. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals* 2004;17(3):271-8.
- [36] Johnson M, Cockayne A, Williams PH, Morrissey JA. Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves *fur*-dependent and *fur*-independent mechanisms. *J Bacteriol* 2005 Dec;187(23):8211-5.
- [37] Mey AR, Craig SA, Payne SM. Characterization of *Vibrio cholerae* *RyhB*: the *RyhB* regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect Immun* 2005 Sep;73(9):5706-19.
- [38] Mikkelsen H, Duck Z, Lilley KS, Welch M. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007 Mar;189(6):2411-6.
- [39] Lazarevic V, Soldo B, Medico N, Pooley H, Bron S, Karamata D. *Bacillus subtilis* alpha-phosphoglucosyltransferase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2005 Jan;71(1):39-45.

- [40] Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, Yantorno OM, et al. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 2008 Dec;8(23-24):4995-5010.
- [41] Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007 Feb;189(3):750-60.
- [42] Neo Y, Li R, Howe J, Hoo R, Pant A, Ho S, et al. Evidence for an intact polysaccharide capsule in *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 2010 Mar;12(3):238-45.
- [43] Nakamura MM, Liew SY, Cummings CA, Brinig MM, Dieterich C, Relman DA. Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2006 Oct;74(10):5537-48.
- [44] Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X, et al. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005 Jun;69(2):326-56.
- [45] Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 2008 Dec;154(Pt 12):3609-23.
- [46] Brumbley SM, Carney BF, Denny TP. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 1993 Sep;175(17):5477-87.
- [47] Sheehan BJ, Dorman CJ. In vivo analysis of the interactions of the LysR-like regulator SpvR with the operator sequences of the spvA and spvR virulence genes of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1998 Oct;30(1):91-105.
- [48] Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* 2006 Jul;61(2):368-82.
- [49] Menozzi FD, Gantiez C, Loch C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 1991 Feb;62(1):59-64.
- [50] Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *Microb Pathog* 2001 May;30(5):279-88.
- [51] Vidakovics ML, Lamberti Y, Serra D, Berbers GA, van der Pol WL, Rodriguez ME. Iron stress increases *Bordetella pertussis* mucin-binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51(2):414-21. Epub 2007 Aug 29.
- [52] Vandebriel RJ, Hellwig SM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, et al. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog* 2003 Jul;35(1):19-29.
- [53] Hazenbos WL, Geuijen CA, van den Berg BM, Mooi FR, van Furth R. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis* 1995 Apr;171(4):924-9.

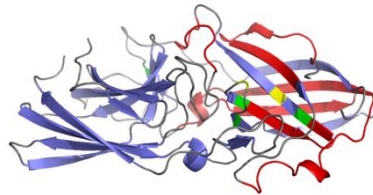
- [54] Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1995 Oct 15;155(8):3972-8.
- [55] Rodriguez ME, Hellwig SM, Perez Vidakovics ML, Berbers GA, van de Winkel JG. *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46(1):39-47.



# Capítulo 4

Análisis de potenciales nuevos  
candidatos vacunales contra

*B. pertussis*





## 4. Análisis de potenciales nuevos candidatos vacunales contra *B. pertussis*

### 4.1 Introducción

El estudio del proteoma que *B. pertussis* expresa bajo estrés nutricional por limitación en hierro posibilitó, entre otras cosas, identificar potenciales componentes para el desarrollo de nuevas vacunas. Nuestro sistema de cultivo *in vitro*, caracterizado por la ausencia de hierro libre, puede no reproducir exactamente el entorno que enfrenta la bacteria *in vivo*, donde el hierro que se encuentra complejo por glicoproteínas y hemoproteínas. Además, *in vivo* las fuentes de hierro varían a lo largo del transcurso de la infección. Por este motivo, entre las proteínas diferencialmente inducidas en limitación de hierro identificadas por proteómica, seleccionamos aquellas que fueron reconocidos por sueros de individuos infectados para evaluar su potencial como componentes de vacunas. El reconocimiento diferencial de las proteínas por sueros de individuos infectados confirma su expresión *in vivo* y su inmunogenicidad en el hombre [1]. En este estudio se evaluó a tres de ellas. Dos son proteínas descritas originalmente como hipotéticas potencialmente involucradas en la adquisición de hierro que encontramos formando parte del subproteoma de membrana externa de *B. pertussis* y que denominamos AfuA (BP1605) e IRP1-3 (BP1152) [1], y que más tarde fueron referenciadas como importantes para la adquisición de hierro durante la infección [2, 3]. La tercera es una lipoproteína, que denominamos Lip (BP2072), sobre-expresada bajo limitación de hierro cuyo estudio como candidato vacunal resulta interesante debido a que las lipoproteínas bacterianas son potentes inmunomoduladores [4].

AfuA presenta homología con proteínas de transporte de hierro claves para la infección en otros patógenos, como por ejemplo FbpA de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* [5, 6], HitA de *Haemophilus influenzae* [7], Sfu de *Serratia marcescens* [8] y FbpA de *Campylobacter jejuni* [9]. En estos patógenos, las proteínas homólogas a AfuA conforman un sistema de tres componentes denominado FbpABC que permite el intercambio de hierro entre receptores de membrana bacterianos y el citosol. La

caracterización de los sistemas de transporte FbpABC de *Neisseria spp.* [10] y de *H. influenzae* [11, 12] ha demostrado su participación en la obtención de hierro a partir de glicoproteínas del hospedador, como transferrina y lactoferrina [7, 13, 14]. Luego del contacto directo de receptores de membrana bacterianos con sus respectivas proteínas de unión a hierro presentes en el hospedador, el metal es removido e introducido al periplasma de la bacteria. El ingreso del hierro al citoplasma es facilitado por el sistema de transporte FbpABC, en el cual FbpA cumple la función de una proteína periplásmica de unión al metal que lo transporta hasta la membrana interna donde la permeasa FbpB lo introduce al citoplasma mediante la energía provista por la ATPasa FbpC. Si bien el análisis del genoma de *B. pertussis* indica que este patógeno carece de receptores de lactoferrina o transferrina, la bacteria es capaz de utilizar estas glicoproteínas como fuente de hierro. La adquisición de hierro a partir de estas proteínas es independiente del contacto célula-proteína [15], lo que sugiere la participación de sideróforos en el proceso de captura del nutriente. Recientemente, utilizando mutantes de *B. pertussis* deficientes en AfuA, Brickman y colaboradores [2] demostraron que esta proteína cumple un rol importante en la utilización de los sideróforos alcaligina y enterobactina [2], lo cual señala la importancia de AfuA en la adquisición de hierro *in vivo*, y por lo tanto, durante la infección.

En relación a la proteína IRP1-3, la misma se encuentra codificada dentro del operón *ftrABCD* recientemente caracterizado [3]. Según investigaciones recientes éste operón codifica para un sistema de captura de hierro involucrado en la captura de este nutriente a bajo pH [3]. Según éste estudio, en condiciones de limitación de hierro y valores de pH 6 o menores el único sistema de captura de hierro de alta afinidad funcional es el codificado por este operón del cuál IRP1-3 es el actor principal. Las condiciones de microentorno *in vivo*, en lo que se refiere a la acidez, están poco caracterizadas por lo que no es fácil predecir el rol de este sistema de captura durante la colonización pero es posible suponer que puede ser importante en alguno de los estadios intracelulares, entre otros nichos no determinados.

Por último, Lip, el tercer inmunógeno evaluado en este estudio, es una lipoproteína putativa de *B. pertussis* sobre-expresada bajo limitación de hierro [1]. Las lipoproteínas bacterianas presentan en su extremo N-terminal la porción lipídica N-palmitoil-S-(2RS)-



2,3-bis-(palmitoiloxo)prolin-cisteína (Pam3Cys), que es capaz de estimular el sistema inmune. Antígenos proteicos o incluso péptidos sintéticos que no presentan inmunogenicidad en ausencia de adyuvante, generan un alto título de anticuerpos cuando se encuentran unidos covalentemente a Pam3Cys [17-19]. Existe evidencia tanto *in vitro* como *in vivo* que indica que las lipoproteínas bacterianas son capaces de activar las células del sistema inmune como monocitos, macrófagos y células dendríticas, mediante la unión a receptores presentes en su superficie [20, 21]. En este contexto, el estudio de Lip como candidato vacunal resulta interesante no sólo por su potencial capacidad antigénica, sino también por sus eventuales propiedades adyuvantes.

En este Capítulo se describen los ensayos realizados con el objetivo de evaluar si estas proteínas reúnen las características necesarias para ser consideradas como nuevos candidatos vacunales.



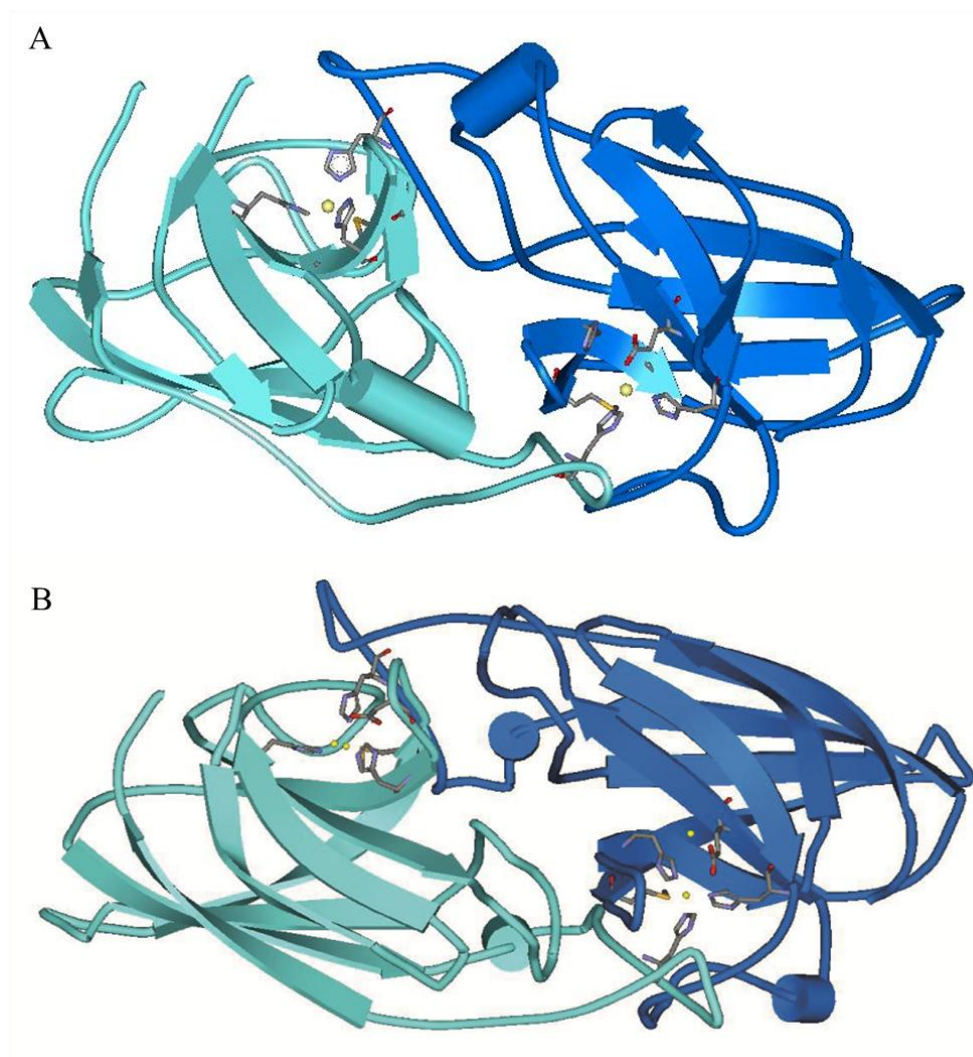
## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Estructura de AfuA, IRP1-3 y Lip

El análisis de la estructura de una proteína contribuye a comprender su función. La estructura cristalográfica de AfuA y su capacidad de unir hierro fue previamente descrita [22]. Para las otras dos proteínas en estudio, Lip e IRP1-3, no existen hasta el momento datos en bibliografía de caracterización de su estructura. En lo que respecta a Lip, la búsqueda en BLAST de secuencias homologas arrojó un grupo de lipoproteínas, tanto putativas como hipotéticas, presentes en distintos patógenos. La ausencia de proteínas homólogas con estructura o función conocida no permitió un estudio profundo del posible papel desempeñado por Lip en *B. pertussis*.

En relación a IRP1-3, el análisis de similitud de secuencia reveló que IRP1-3 pertenece a una familia de proteínas de unión a hierro muy conservadas en bacterias. La búsqueda en BLAST permitió identificar 193 secuencias similares a IRP1-3 con un valor-E menor a  $1 \times 10^{-4}$ . La mayoría de estas secuencias son proteínas anotadas como antígenos de membrana, entre las cuales se encuentran dos proteínas de unión a hierro bien caracterizadas: P19 de *Campylobacter jejuni* [23] y Tp34 de *Treponema pallidum* [24]. Usando la estructura de P19 como molde, se construyeron modelos estructurales para IRP1-3 usando el programa MODELLER [25]. La calidad del mejor modelo seleccionado por dicho programa fue a su vez analizada utilizando el programa PROSAIL. En la Figura 1 se muestra la estructura cristalina de P19 y el modelo obtenido para IRP1-3. La comparación muestra una misma topología global y, al igual que lo observado en la estructura cristalográfica de P19 (código 3LZL en Protein Data Bank), el modelo estructural muestra que IRP1-3 adoptaría una conformación similar a la adoptada por las inmunoglobulinas.

Recientemente, Chan y colaboradores [26] demostraron que P19 tiene un sitio de unión a hierro y otro sitio de unión a cobre, que se encuentran próximos en la proteína nativa. Asimismo, comprobaron que la proteína es capaz de formar un dímero y que las esferas de coordinación de los metales se encuentran en la interfase del dímero [23].



**Figura 1. Modelado estructural de IRP1-3.** Modelo estructural de IRP1-3 basado en la estructura de la proteína P19 de *C. jejuni* (PDB code 3LZL). La figura muestra la estructura cristalográfica de la proteína P19 (A) y el probable arreglo dimérico de la proteína IRP1-3 (B). En ambas figuras, cada una de las cadenas que conforma el dímero se encuentra representada en distinto color. Las esferas representan los átomos de hierro o cobre.

El análisis de conservación de estructura y de secuencia mostró que todos los residuos relevantes para la unión a ambos metales se encuentran bien conservados en IRP1-3 (Fig. 2A). El sitio de unión a cobre parece estar formado por los residuos His 61, 114 y 147 y Met 107, mientras que el sitio de unión a hierro por los residuos Glu 63 y Asp 111 (Fig. 2B). Análisis de predicción indican que ambos sitios estarían ubicados en la interfase de la forma dimérica de la proteína, como ocurre en P19. La conservación evolutiva de los residuos de la interfase sustenta la idea que IRP1-3 podría adoptar la forma dimérica típica de esta familia de proteínas de unión a hierro.

A

<i>B. pertussis</i>	-----MMKKLLALALSLPG---AFAFEPYPIGKFAEKGGMEICAVYLCPIEMEPFGMM	52
<i>B. abortus</i>	--MKNLFRTALMVPLSLALAY--GAQAREIPICKPQLGGMEIAAVYLCPIEMEPFGMM	56
<i>C. jejuni</i>	-----CBVPICDEKELNGMEIAAVYLCPIEMEPFGID	32
<i>H. parainfluenzae</i>	---MKKALLTALFAGIFT--ASTANAFCEYPIGEAVTNEMEIAAVYKPIDMEPRGMM	55
<i>E. coli</i>	MMTMKKTLLISAVMASIFI--APAAFAFKEYPAGEEVTNEMELAAYVLCPIEMEPFGMM	58

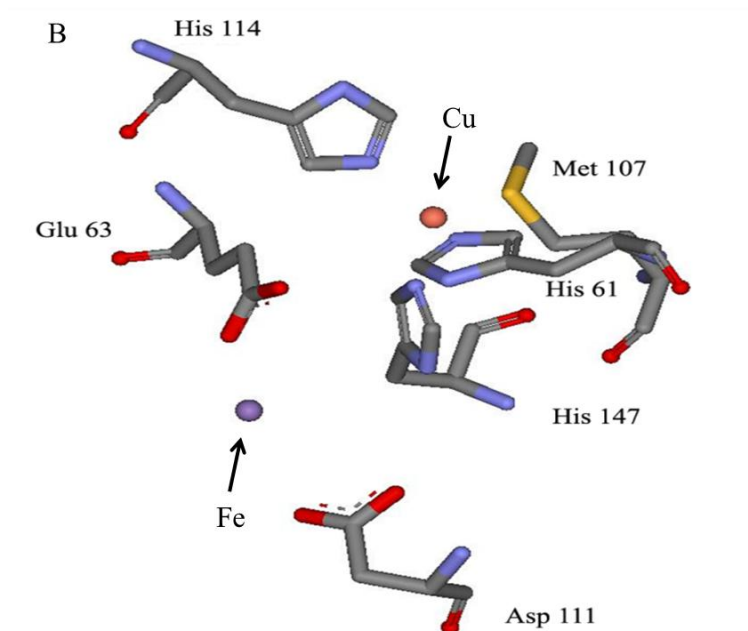
<i>B. pertussis</i>	RAAKSDVHLEADIHATAGNATGEPGEWVPYLVVKYEVQKVG--SDKVCKGTMPMVAND	111
<i>B. abortus</i>	REAKSDVHLEVDIRPAKDNNGEAEGLWVPYLVVSYELTHLEN--GKVCCKGTMPMVAND	115
<i>C. jejuni</i>	LAASLADIHLEADIHALKNNENGEPGEWMPYLTAYELKNTT--TGAIKRGTMPMVAND	91
<i>H. parainfluenzae</i>	LEAAKSDIHLEADIHAVKCNKNGEGDGWMPYLTINYTLVNTT--TGEKCEGTMPMVAND	114
<i>E. coli</i>	LEAAKADVHLEADIHAVECNKNGEGAGWIPYLTISYTLVNN--TGEKCEGTMPMVAND	117

<i>B. pertussis</i>	GPHYGINVKLDG-----EGKYKIKYTIMPPADKMNHFGRHIDKETGVGPWKEPELIE	164
<i>B. abortus</i>	GPHYGINVKLDG-----EGKYKIKLFVSPPSANQHAHFGRHIDKETGVGPWKEPEVTAE	168
<i>C. jejuni</i>	GPHYGANIAEKDKKGGFGVGNVETIYISNPEK---QGFGREHDEETGVGKWEPEPEKVD	148
<i>H. parainfluenzae</i>	GPHYGINVKMMG-----VGNVETIYHIDEPK---AGMHRHIDSETGVGRWKKPEPVS	164
<i>E. coli</i>	GPHYGANIKMMG-----VGNVETIYHIDEPK---AGMHRHIDSETGVGRWKKPEPVS	167

<i>B. pertussis</i>	YEFVETAGTGKKGGY	178
<i>B. abortus</i>	YEFVETAGTGKKGAY	182
<i>C. jejuni</i>	YKFKYTGTPK----	158
<i>H. parainfluenzae</i>	YEFKETGKIK-----	173
<i>E. coli</i>	YEFKYVGLN-----	176

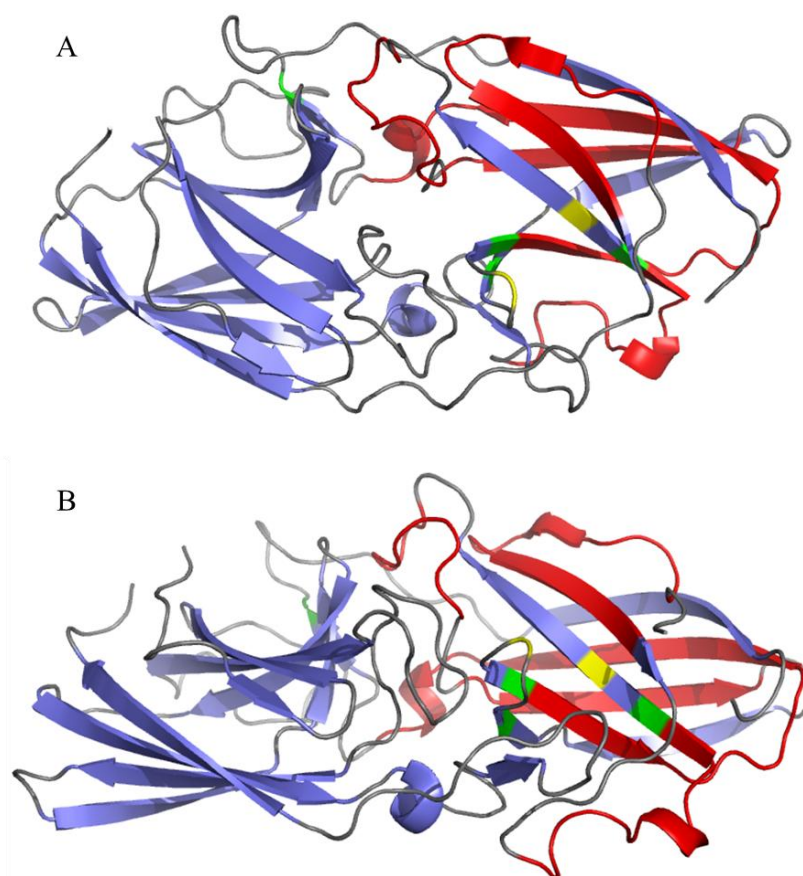


**Figura 2. Posibles sitios de unión a hierro y a cobre de IRP1-3.** **A.** El alineamiento de secuencias muestra distintos miembros representativos de la familia de proteínas de unión a hierro. Los puntos negros indican los residuos involucrados en la unión a hierro y a cobre. Utilizando la numeración de IRP1-3 los residuos de unión a cobre son His 61, 114, 147, Glu 63 y Met 107, mientras que los de unión a hierro son Glu 63 y Asp 111. Otros residuos importantes para la unión a los metales también se encuentran conservados e indicados en la figura mediante cuadrados negro (Asp 65 and Asp 111). **B.** Ampliación de los sitios de unión a metal. Las esferas naranjas representan los átomos de cobre y las violetas los de hierro.

Además, el uso de programas para predicción de segmentos transmembrana en proteínas, permitió identificar un posible segmento transmembrana dentro de los 30 primeros aminoácidos. Esta predicción concuerda con la identificación de IRP1-3 en el subproteoma de membrana externa de *B. pertussis* observado previamente [1].

Muchas de las proteínas que presentaron homología con IRP1-3 en el análisis mediante BLAST son probables antígenos de membrana. Nuestros resultados indican la

presencia de anticuerpos capaces de reconocer a esta proteína en sueros de individuos infectados [1], lo que sugiere que IRP1-3 es antigénica y además se encuentra expresada durante la infección. En este trabajo se analizó el modelo estructural obtenido para IRP1-3 utilizando el software de predicción de epitopes DiscoTope 2.0 [27], con el objetivo de identificar posibles epitopes conformacionales. Este análisis permitió identificar 5 posibles epitopes, cuya ubicación en el modelo estructural de la proteína se indica en la Figura 3 sobre uno de los monómeros que conforman el dímero. Como puede observarse en dicha figura, los epitopes predichos (señalados en rojo) cubren gran parte de la proteína. En esta Figura también se indican los residuos involucrados en la unión al cobre (en verde) y al hierro (en amarillo). Cabe destacar que, si bien sólo los residuos His 61 y 114 se encuentran incluidos dentro de alguno de los epitopes predichos, en el modelo puede observarse que algunos de los posibles epitopes se ubican en la interfase cercanos a la zona donde se encontraría el metal. De esta forma, es posible especular que anticuerpos capaces de reconocer a esta proteína podrían interferir en la unión del metal.



**Figura 3. Representación de posibles epitopes sobre el modelo de IRP1-3.** La figura muestra una vista de frente (**A**) o de contrafrente (**B**) del modelo estructural de IRP1-3 donde se señalan en rojo los posibles epitopes conformacionales identificados mediante el programa DiscoTope. Los residuos posiblemente involucrados en la unión a cobre y a hierro se indican en color verde y amarillo respectivamente.

Finalmente, se realizó un estudio de comparación de secuencias de AfuA, IRP1-3 y Lip entre las distintas especies del género *Bordetella* de importancia clínica *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, que demostró que las tres proteínas se encuentran altamente conservadas, presentando un 99,4% de identidad en el caso de AfuA e IRP1-3, y un 97,8% para el caso de Lip.

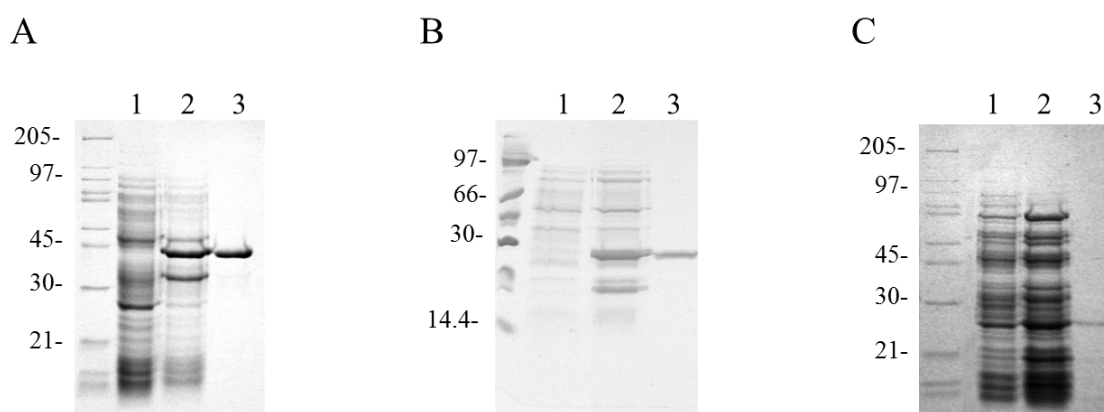
#### 4.2.2 Clonado y purificación de las proteínas recombinantes rAfuA, rIRP1-3 y rLip

Como ya se mencionó, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo demostraron la presencia de anticuerpos dirigidos contra AfuA, IRP1-3 y Lip en un pool de sueros de individuos infectados [1]. Para llevar a cabo estos ensayos cada una de las proteínas utilizadas debieron ser recuperadas de geles 2-DE. Para llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación fue necesario clonar cada una de estas proteínas en *E. coli* de modo de contar con un método de producción rápido y de buen rendimiento. Para ello, los genes que codifican para las proteínas AfuA, IRP1-3 y Lip se amplificaron a partir de ADN genómico de *B. pertussis* utilizando cebadores específicos, y se clonaron en el vector pET28a, generando las construcciones pET28a-AfuA, pET28a-IRP1-3 y pET28a-Lip, respectivamente, las cuales se utilizaron para transformar células de *E. coli* competentes. La expresión de cada una de las proteínas recombinantes se llevó a cabo mediante la inducción por agregado de ITPG. En el caso de rAfuA y rIRP1-3 la expresión se realizó siguiendo protocolos estándares de inducción. Las bacterias se cultivaron en medio LB a 37°C y agitación hasta alcanzar una DO próxima a 0,4, momento en el cual se indujo la expresión de las proteínas recombinantes por el agregado de IPTG, permitiendo la expresión durante 3hs de incubación en las mismas condiciones. En el caso particular de Lip debimos



optimizar la producción de la proteína recombinante, ya que el protocolo estándar utilizado para AfuA e IRP1-3 conducía a la muerte de la bacteria y no permitía recuperar la proteína. Esto no es llamativo, es común que las lipoproteínas recombinantes sean lipidadas dentro de la célula huésped resultando tóxicas debido a su elevada producción. Se evaluaron distintos protocolos de inducción en los que se varió la absorbancia alcanzada al momento de agregar IPTG, la concentración de IPTG y la temperatura de incubación durante la inducción. El protocolo que permitió el mayor rendimiento consiste en permitir el crecimiento de la bacteria hasta alcanzar una DO de 0,8, momento en el cual se agrega IPTG y se cultiva durante 1h a 37°C en agitación.

Cada una de las proteínas recombinantes se obtuvieron fusionadas a un *tag* de histidinas (His<sub>6</sub>) en el extremo N-terminal lo que permitió su purificación mediante el uso de columnas de afinidad de cobalto, obteniéndose una única proteína de aproximadamente 40 kDa en el caso de rAfuA y de alrededor de 25 kDa tanto en el caso de rIRP1-3 como en el de rLip. La Figura 4 muestra los perfiles proteicos de lisados de células de *E. coli* obtenidas previa y posteriormente a la inducción de la expresión de cada proteína. Además se muestran cada una de las proteínas purificadas obtenidas a partir de un mismo volumen de cultivo. Como puede observarse, el rendimiento en la producción de rLip es menor que el obtenido para las otras dos proteínas recombinantes, aun iniciando la inducción de la expresión de la proteína a mayor DO (Fig. 4A, B y C línea 3).

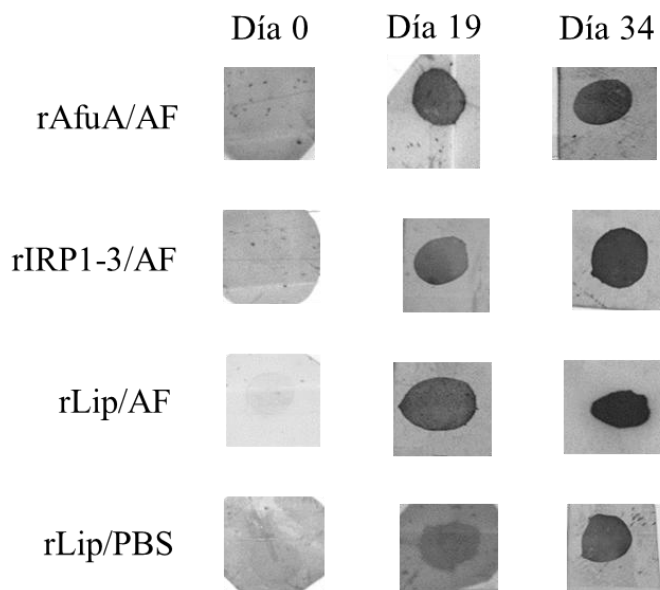


**Figura 4. Producción de AfuA, IRP1-3 y Lip recombinantes.** SDS-PAGE mostrando la

inducción y purificación de rAfuA, rIRP1-3 y rLip en *E. coli*. Las bacterias fueron cultivadas hasta alcanzar DO 0,4 en el caso de AfuA e IRP1-3, o DO 0,8 en el caso de Lip. Alcanzada la respectiva DO, la expresión de proteínas recombinantes fue inducida mediante el agregado de IPTG 0,5 mM durante 3 hs en el caso de AfuA e IRP1-3, o durante 1 h en el caso de Lip. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad. **A.** Línea 1: *E. coli*-rAFUA sin agregado de IPTG, línea 2: *E. coli*-rAfuA luego del agregado de IPTG, línea 3: rAfuA, **B.** Línea 1: *E. coli*-rIRP1-3 sin agregado de IPTG, línea 2: *E. coli*-rIRP1-3 luego del agregado de IPTG, línea 3: rIRP1-3, **C.** Línea 1: *E. coli*-rLip sin agregado de IPTG, línea 2: *E. coli*-rLip luego del agregado de IPTG, línea 3: rLip.

#### 4.2.3 Capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes, rAfuA, rIRP1-3 y rLip

El primer paso luego de producir las proteínas recombinantes, fue evaluar la capacidad de estas proteínas para generar anticuerpos *in vivo*. Para ello, tres grupos de ratones BALB/c se inmunizaron con rAfuA, rIRP1-3 o rLip formuladas en adyuvante de Freund completo. Además se agregó un grupo de ratones inmunizados con rLip en ausencia de adyuvante para evaluar la antigenicidad de la proteína sola. Los ratones recibieron una dosis refuerzo el día 19 con la respectiva proteína formulada en adyuvante de Freund incompleto, menos en el caso de rLip que se la inyectó sin adyuvante. Como control negativo un grupo de ratones se inmunizó con adyuvante solo o PBS siguiendo el mismo plan de inoculación. Se recolectaron muestras de suero al momento de cada inmunización (día 0 y 19, respectivamente) y 15 días después de la segunda dosis (día 34). La presencia de anticuerpos específicos en cada una de las muestras fue evaluada mediante ensayos de dot blot con la respectiva proteína recombinante. La Figura 5, muestra la presencia de anticuerpos específicos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 y anti-rLip luego de la primera inmunización, lo que demuestra la antigenicidad de las proteínas recombinantes. Además, los sueros de los ratones inmunizados con rLip en ausencia de adyuvante también presentaron anticuerpos capaces de reconocer a la proteína.

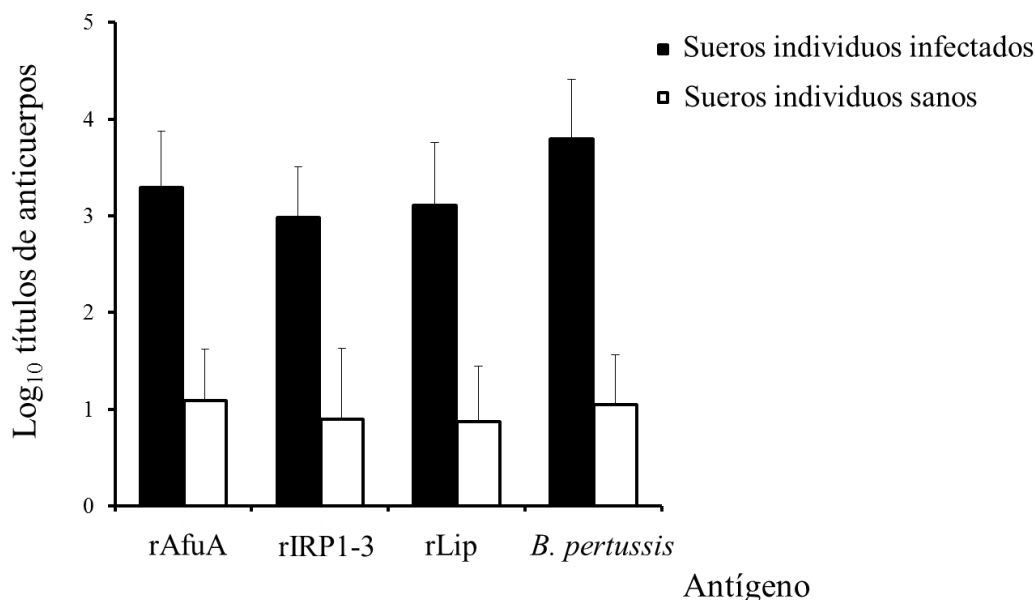


**Figura 5. Inmunogenicidad de AfuA, IRP1-3 y Lip recombinantes.** Membranas PVDF fueron cargadas con proteína recombinante e incubadas con el respectivo anti-suero. Las muestras de suero evaluadas fueron obtenidas antes (Día 0) y 19 días después de la primera inmunización (Día 19) y 15 días después de la segunda inmunización (Día 34) con la proteína respectiva.

#### 4.2.4 Evaluación del título de anticuerpos contra AfuA, IRP1-3 y Lip en sueros de individuos infectados con *B. pertussis*

Como se mencionó anteriormente, en ensayos preliminares de inmunodetección observamos la presencia de anticuerpos anti-AfuA, anti-IRP1-3 y anti-Lip en un pool de sueros de individuos infectados con *B. pertussis* mediante ensayos de dot blot llevados a cabo utilizando las proteínas recuperadas de geles de electroforesis bidimensionales [1]. El clonado, producción y purificación de las proteínas recombinantes nos permitió profundizar este análisis y evaluar el título de los anticuerpos contra AfuA, IRP1-3 y Lip en un panel de sueros de individuos infectados empleando ensayos de ELISA. Además, en estos ensayos se determinó el título de anticuerpos anti-*B. pertussis* en los sueros. En primer lugar, se optimizaron las condiciones para llevar a cabo dichos ensayos en placas sensibilizadas con rAfuA, rIRP1-3, rLip o células de *B. pertussis*, respectivamente, según se describe en el Capítulo 2. La Figura 6 muestra los títulos de anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-rLip y anti-*B. pertussis* presentes en el panel de sueros. Según se observa, todos los sueros

presentaron elevado título de anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas. Un panel de sueros negativos para *B. pertussis* se utilizó como control. Estos resultados confirman la inmunogenicidad de estas tres proteínas y su expresión durante la infección.



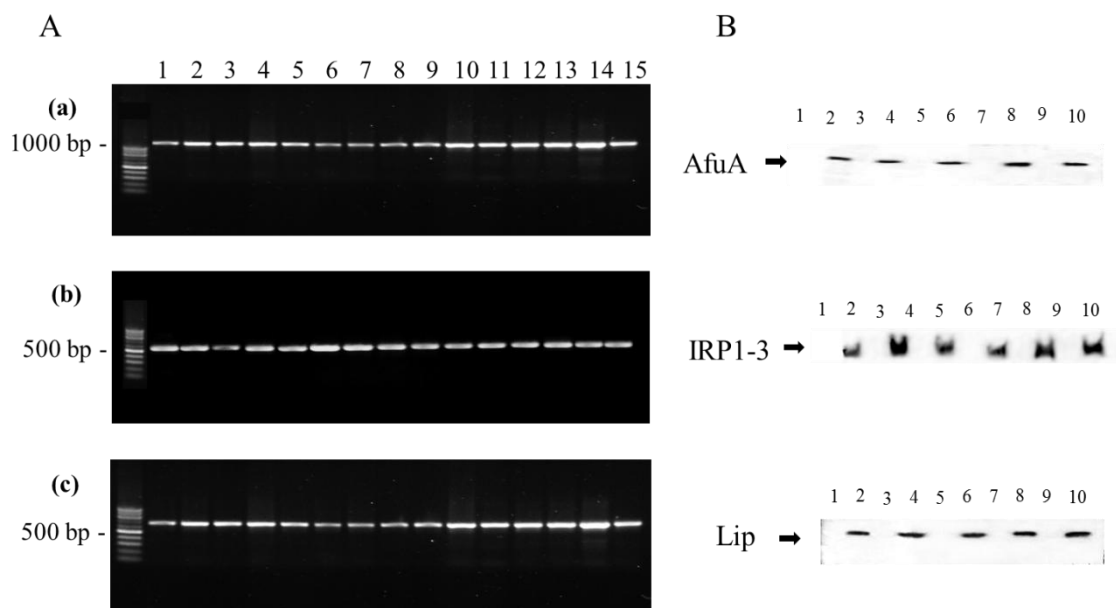
**Figura 6. Título de anticuerpos dirigidos contra AfuA, IRP1-3, Lip y *B. pertussis* en sueros de individuos infectados.** El título de anticuerpos presentes en sueros de individuos infectados con *B. pertussis* (barras negras) y en sueros de individuos sanos (barras blancas) fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con rAfuA, rIRP1-3, rLip o *B. pertussis*. Los resultados muestran la media  $\pm$  DE de 12 sueros evaluados.

#### 4.2.5 Evaluación de la conservación de AfuA, IRP1-3 y Lip en aislados clínicos de *B. pertussis*

Con el fin de evaluar la posibilidad de utilizar estos antígenos como candidatos vacunales, también se estudió si los mismos se encuentran conservados en cepas circulantes de *B. pertussis*. En primer lugar analizamos si los genes que codifican para cada proteína se encuentran presentes en un panel de 14 aislados clínicos de *B. pertussis* provenientes de pacientes argentinos en el período 2002-2007. Mediante ensayos de PCR con cebadores

específicos, se amplificaron los genes *afuA*, *irp1-3* y *lip* a partir de DNA genómico de cada aislado clínico. Como control positivo se utilizó DNA genómico de *B. pertussis* Tohama I. Como puede observarse en la Figura 7A, los tres genes están presentes en todas las cepas evaluadas y todos los fragmentos presentan el tamaño esperado, indicando que no hubo variación en la longitud de ninguno de los genes en los aislados analizados. Con el fin de evaluar la conservación de la secuencia de *afuA*, *irp1-3* y *lip*, los productos de PCR de los aislados clínicos de cada uno de los genes fueron secuenciados (Macrogen Inc., Seoul, Korea), y comparados con la secuencia de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I. El alineamiento de las secuencias demostró que el gen se encuentra altamente conservado en todas las cepas.

Si bien los resultados anteriores confirman la conservación de los genes en los aislados clínicos, no aseguran la expresión de las proteínas. Por este motivo decidimos evaluar si las cepas clínicas expresan AfuA, IRP1-3 y Lip. Con este objetivo, 4 aislados clínicos seleccionados al azar se cultivaron en ausencia de hierro y se analizaron mediante ensayos de western blot. Para ello las bacterias fueron lisadas, e igual cantidad de proteínas de cada una de las cepas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF que se incubó con anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 o anti-rLip, respectivamente. Como control positivo de la expresión se utilizó la cepa *B. pertussis* Tohama. Además, cada cepa se cultivó en exceso de hierro como control negativo de la expresión. Como puede observarse en la Figura 7B, AfuA, IRP1-3 y Lip se detectaron en los lisados de todos los aislados clínicos evaluados, confirmando así la expresión de cada una de las proteínas en las cepas circulantes en limitación de hierro.



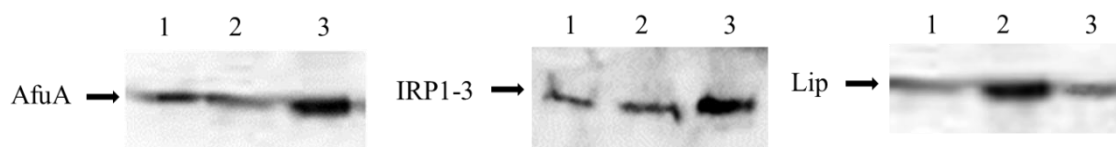
**Figura 8. Conservación de AfuA, IRP1-3 y Lip entre cepas argentinas circulantes de *B. pertussis*.** A. Geles de agarosa mostrando productos de PCR utilizando aislados clínicos de *B. pertussis* (líneas 1 a 14) o *B. pertussis* Tohama (línea 15) como molde y cebadores específicos para *afuA* (a), *irp1-3* (b) y *lip* (c). B. Inmunoblot de 4 aislados clínicos seleccionados al azar cultivados en exceso (líneas 1, 3, 5 y 7) o *B. pertussis* Tohama (línea 9) o en ausencia (líneas 2, 4, 6, 8 y 10) de hierro, revelados con sueros anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 o anti-rLip.

#### 4.2.6 Estudio de la regulación de la expresión de AfuA, IRP1-3 y Lip por el regulador de virulencia de *B. pertussis* BvgAS

Como se mencionó anteriormente, el sistema de dos componentes de *B. pertussis* BvgAS, regula la expresión de la mayoría de los factores de virulencia de este patógeno en respuesta a ciertas condiciones del entorno. Los antígenos incluidos en las vacunas acelulares actualmente en uso son factores de virulencia regulados positivamente por este sistema. Se ha sugerido que durante la transmisión de hospedador a hospedador estos factores de virulencia podrían estar regulados negativamente por las condiciones de entorno, lo que determinaría su ausencia en el fenotipo infectante [28]. En este contexto, si

las condiciones de entorno son tales que disminuyen la expresión de los genes regulados positivamente por el sistema BvgAS es importante determinar la dependencia de nuevos posibles candidatos vacunales con este sistema. Con el fin de evaluar si AfuA, IRP1-3 y Lip se encuentran reguladas por el sistema BvgAS, en primer lugar se analizaron las secuencias corriente arriba de los respectivos genes, para evaluar la presencia de la secuencia consenso de unión de la proteína BvgA [29]. Ninguna de las variantes de la secuencia heptamérica TTT(C/C)NTA de unión de la proteína BvgA fue hallada en ninguno de los tres genes, sugiriendo que la expresión de estas proteínas no se encuentra regulada por el sistema BvgAS.

Para confirmar la independencia de la expresión de estas proteínas del sistema de regulación global de la virulencia BvgAS se realizaron ensayos de western blot. *B. pertussis* Tohama se cultivó en limitación de hierro, para inducir la expresión de las proteínas en estudio, ya sea en ausencia o en presencia de  $MgSO_4$ . Como se mencionó anteriormente, el  $MgSO_4$  es uno de los agentes moduladores de la virulencia de la bacteria. Una cepa mutante de *B. pertussis* Bvg(-) defectiva en todos los factores de virulencia, BP537, cultivada en ausencia de hierro se utilizó como control. Las bacterias se lisaron y las suspensiones proteicas se sometieron a ensayos de western blot revelados con anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 o anti-rLip. La Figura 8 muestra que tanto en ausencia como en presencia del agente modulante, la bacteria expresa cada una de las tres proteínas cuando se cultiva en limitación de hierro, lo que confirma que ninguna de las proteínas está regulada por el BvgAS. La presencia de las tres proteínas en la muestra de proteínas correspondiente a la cepa mutante Bvg(-) (Fig. 9, línea 3), confirma este resultado.

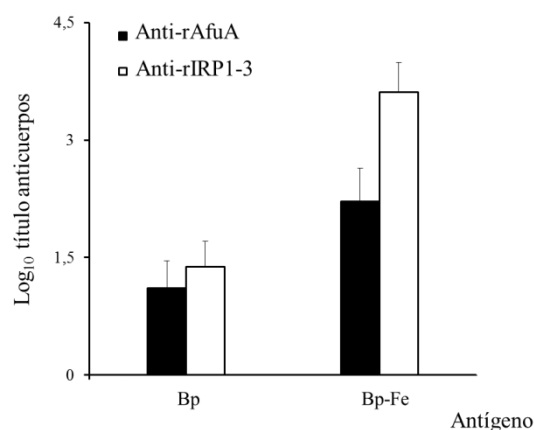


**Figura 8.** Estudio de la regulación de la expresión de AfuA, IRP1-3 y Lip por el sistema de dos

**componentes BvgAS.** *B. pertussis* Tohama (líneas 1 y 2) y BP537 Bvg(-) (línea 3) fueron cultivadas en ausencia de hierro y en presencia (línea 1) o ausencia (línea 2) de concentraciones modulantes de  $MgSO_4$ . Las bacterias fueron lisadas y sometidas a ensayos de western blot utilizando anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 o anti-rLip.

#### 4.2.7 Evaluación de la localización celular de AfuA e IRP1-3

Como se mencionó anteriormente, AfuA e IRP1-3, a diferencia de Lip, se encontraron formando parte del subproteoma de membrana externa de *B. pertussis* [1], lo que indica que podrían encontrarse expuestas en la superficie bacteriana. Para evaluar esta posibilidad, realizamos ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células enteras de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro inactivada por calor. El título de anticuerpos presentes en los antisueros anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 se utilizó como una medida de la capacidad de los sueros de reconocer a la respectiva proteína expuesta en la superficie bacteriana. Como control se realizaron los mismos ensayos en placas sensibilizadas con bacterias cultivadas en exceso de hierro. La Figura 9 muestra que los sueros de ratones inmunizados con rIRP1-3 presentan elevado título de anticuerpos, lo que sugiere que la proteína podría encontrarse expuesta en la superficie bacteriana. Los resultados obtenidos en estos ensayos también indicaron que la capacidad de sueros de ratones inmunizados con rAfuA de reconocer a la bacteria es baja, sugiriendo que tal vez esta proteína no se encuentra expuesta en la superficie (Fig. 9).

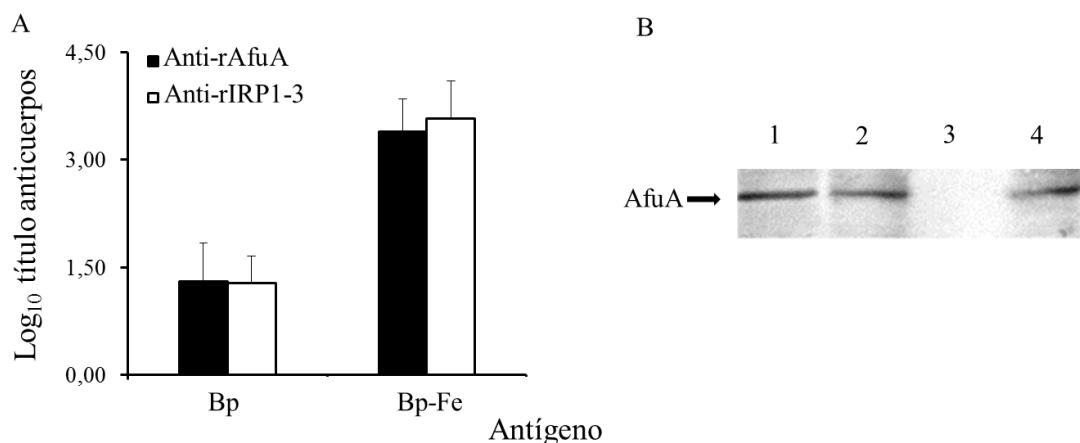




**Figura 9. Reconocimiento de AfuA e IRP1-3 por sueros de ratones inmunizados.** El título de sueros de ratones inmunizados con rAfuA o con rIRP1-3 (n=6) fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células enteras de *B. pertussis* cultivada en exceso (Bp) o ausencia de hierro (Bp-Fe) inactivadas por calor. Los resultados muestran la media  $\pm$  DE.

Sin embargo, otra explicación para estos resultados podría ser que la proteína se libere de la superficie al medio durante el tratamiento de inactivación por calor, una característica observada en otras proteínas de membrana externa [30]. Con el objetivo de evaluar esta posibilidad, se realizaron ensayos similares a los descritos pero con placas de ELISA sensibilizadas con células de *B. pertussis* viva. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. Por un lado, observamos que el título anti-*B. pertussis* de los sueros de los ratones inmunizados con rIRP1-3 fue similar al obtenido cuando los ensayos se realizan con bacterias inactivadas por calor (Fig. 10A). Esto demuestra que la exposición de la proteína en la superficie bacteriana observada en la Figura 9A no es consecuencia del tratamiento térmico. Por otro lado, puede observarse que sueros de ratones inmunizados con rAfuA presentan alto título anti-*B. pertussis* (Fig. 10A), lo que sugiere que los anticuerpos reconocen la proteína expuesta en la superficie bacteriana y que la falta de reconocimiento en los ensayos previos es debida a la pérdida de la proteína durante el tratamiento térmico.

La liberación de AfuA al medio como consecuencia del tratamiento térmico se confirmó mediante ensayos de western blot. Muestras de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro sometidas o no a tratamientos térmico (56 °C durante 30 min) se lisaron y las suspensiones proteicas fueron sometidas a SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, e incubadas con anticuerpos anti-rAfuA específicos. En la Figura 10B puede observarse que el tratamiento térmico conduce a la aparición de la proteína en el sobrenadante y a la consecuente disminución del nivel de proteína en la bacteria.



**Figura 10. Exposición de AfuA e IRP1-3 en la superficie de *B. pertussis*.** **A** El título de sueros de ratones inmunizados con rAfuA (n=6) o con rIRP1-3 (n=6) fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células vivas de *B. pertussis* cultivadas en exceso (Bp) o ausencia de hierro (Bp-Fe). Los resultados muestran la media  $\pm$  DE. **B.** *B. pertussis* cultivada en ausencia de hierro y sometida o no a tratamiento térmico a 56°C durante 30 min. Proteínas totales presentes en los lisados celulares y en los sobrenadantes, fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF y reveladas con suero anti-rAfuA específico. Las calles 1 y 2 corresponden al sobrenadante y lisado, respectivamente, de la bacteria sometida a tratamiento térmico. Las calles 3 y 4 corresponden al sobrenadante y lisado, respectivamente, de la bacteria de células no tratadas.

Estos resultados indican que tanto AfuA como IRP1-3 se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y que el tratamiento térmico conduce a la liberación de AfuA, pero no de IRP1-3, al medio extracelular. Estos resultados muestran además que los anticuerpos generados por inmunización con cada una de las proteínas recombinantes son capaces de reconocer a la respectiva proteína nativa en la superficie de la bacteria.

### 4.3 Discusión

La reemergencia de la tos convulsa en las últimas dos décadas refleja la baja eficiencia de las vacunas contra *B. pertussis* actualmente en uso y evidencia la necesidad de buscar nuevos inmunógenos.

Los antígenos vacunales deben cumplir una serie de características como son inmunogenicidad, expresión durante la infección y conservación entre cepas circulantes. También es deseable, aunque no excluyente, que se encuentren expuestos en la superficie bacteriana. Así, frente a nuevos candidatos vacunales los primeros estudios deben apuntar a evaluar estas características. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo [1] permitieron identificar un grupo de proteínas, cuya expresión se encuentra inducida cuando *B. pertussis* se cultiva en limitación de hierro, que son reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de individuos infectados. La inducción de estas proteínas en estas condiciones de cultivo se confirmó en este trabajo de Tesis. De las proteínas identificadas, seleccionamos tres en base a sus características, denominadas AfuA, IRP1-3 y Lip y evaluamos si cumplen con las condiciones descritas anteriormente. AfuA e IRP1-3, son particularmente interesantes por dos motivos, por un lado porque están involucradas en la captura de hierro durante la colonización, lo que determina la necesidad de la bacteria de expresar estas proteínas dentro del huésped, y por su potencial localización en membrana externa. La lipoproteína Lip fue seleccionada en base a su potencialidad de presentar propiedades adyuvantes, propiedad común a la mayoría de las lipoproteínas bacterianas [4].

El conocimiento de la estructura de una proteína ayuda a comprender su función. En particular, por tratarse de proteínas potencialmente involucradas en la nutrición bacteriana, el estudio de la estructura de AfuA e IRP1-3 puede contribuir a conocer el papel que juegan estas proteínas durante la infección. Como se mencionó anteriormente, AfuA es una proteína que presenta homología con proteínas de unión a hierro presentes en otros patógenos, las cuales conforman un sistema de tres componentes que permite el intercambio de hierro entre receptores de membrana y el citosol [6, 7]. La estructura cristalográfica de AfuA de *B. pertussis* fue determinada por Tom-Yew quien además describió su capacidad para unir hierro [22]. Tom-Yew también demostró que, al igual que

lo que ocurre con proteínas homólogas a AfuA [31], la presencia de aniones, como por ejemplo carbonato, oxalato y citrato, tiene un efecto sinérgico en la unión de la proteína al metal y señaló que esta interacción es necesaria para el eficiente transporte de hierro *in vivo* [22]. En lo que respecta a IRP1-3, hasta el momento no se ha descrito ningún estudio estructural. En este estudio se llevaron a cabo análisis bioinformáticos tendientes a caracterizar la estructura de esta proteína. Los análisis de comparación de secuencia mediante búsqueda en BLAST mostraron que IRP1-3 comparte homología con un conjunto de proteínas involucradas en el transporte de hierro, la mayoría de las cuales corresponden a antígenos de membrana. La estructura cristalográfica de la proteína P19 de *C. jejuni* [23], con la cual IRP1-3 comparte alta homología, se utilizó como molde para la obtención de un modelo estructural de IRP1-3. Se sabe que P19 es una proteína dimerica capaz de unir cobre y hierro, necesaria para la captura de tales nutrientes por la bacteria en condiciones de estrés nutricional [26]. El modelo obtenido para IRP1-3 presenta un alto grado de conservación en todos los residuos relevantes para la unión a ambos metales, apoyando la hipótesis de su rol en la adquisición de nutrientes. Al igual que lo que ocurre en P19, el sitio de unión a los metales en el dímero parecería encontrarse en la interfase formada por los dos monómeros. Además, se realizaron estudios de predicción de epitopes conformacionales utilizando el modelo estructural obtenido para IRP1-3. Los resultados mostraron que parte de los epitopes predichos se encuentran próximos la interfase formada por los monómeros, por lo que anticuerpos dirigidos contra esta proteína podrían interferir en su unión al metal. En relación a la lipoproteína Lip, si bien la búsqueda en BLAST mostró que posee homología con distintas lipoproteínas presentes en otras bacterias, ninguna de estas lipoproteínas posee estructura o función conocida.

La producción de las proteínas AfuA, IRP1-3 y Lip recombinantes nos permitió realizar un estudio más profundo de la inmunogenicidad *in vivo* de estas proteínas mediante el empleo de modelos animales, y la determinación del título de anticuerpos específicos contra cada una de ellas en sueros de individuos infectados. Todos los sueros de individuos infectados ensayados en este estudio presentaron alto título de anticuerpos anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 y anti-rLip, confirmando no solo que las proteínas son expresadas por el fenotipo infectante de *B. pertussis*, sino que además son altamente inmunogénicas. Otro resultado

interesante, es que los anticuerpos generados por la infección con *B. pertussis* son capaces de reconocer a las proteínas recombinantes.

Los altos títulos de anticuerpos anti-AfuA, anti-IRP1-3 y anti-Lip generados por la infección demuestran la capacidad inmunogénica de las proteínas al menos en el contexto de la célula bacteriana entera. Sin embargo, esto no asegura que la inmunización con vacunas formuladas con cada una de las proteínas recombinantes genere anticuerpos. En este Capítulo demostramos que la inmunización de ratones con rAfuA, rIRP1-3 o rLip conduce a la producción de anticuerpos dirigidos contra la respectiva proteína, señalando su inmunogenicidad *in vivo*, aún en formulaciones monovalentes. Por otro lado, la producción de anticuerpos anti-rLip específicos en los sueros de ratones inmunizados con la proteína en ausencia de adyuvantes, sugiere que la lipoproteína presenta propiedades adyuvantes.

Otro aspecto importante a evaluar es la localización celular de los nuevos inmunógenos. Proteínas de superficie de *B. pertussis* son atractivos candidatos vacunales por su potencialidad para generar anticuerpos capaces de actuar como opsoninas, críticos para la eliminación bacteriana mediada por células [16, 33]. Entre los antígenos incluidos en las vacunas acelulares actualmente en uso, sólo la proteína de membrana externa Prn es capaz de generar anticuerpos opsonizantes [33]. El surgimiento de cepas circulantes deficientes en esta proteína [34-36] resalta la necesidad de buscar nuevos antígenos que generen este tipo de anticuerpos. Dos de las proteínas estudiadas en este trabajo, AfuA e IRP1-3, fueron previamente identificadas en el subproteoma de la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro [1], lo que sugiere su exposición en la superficie bacteriana. El análisis bioinformático de IRP1-3 realizado en este trabajo reveló la presencia de un posible segmento transmembrana, lo que también sugiere una probable localización en membrana. Por otro lado, aunque existen trabajos recientes que señalan que AfuA podría estar en el espacio periplásmico [2], la proteína homóloga de *N. meningitidis* ha sido encontrada expuesta, al menos en parte, en la superficie de la bacteria [37, 38]. Mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con bacterias cultivadas en limitación de hierro vivas pudimos comprobar que los sueros de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes son capaces de reconocer a la bacteria, lo que demuestra la exposición de las proteínas en su superficie. Asimismo, el

mayor reconocimiento de AfuA y de IRP1-3 en las bacterias cultivadas en limitación de hierro respecto a las cultivadas en exceso de hierro confirma la sobre-expresión de estas dos proteínas bajo la limitación de este nutriente observada previamente [1]. Es interesante destacar que el tratamiento térmico de las bacterias conlleva a la liberación de AfuA al medio extracelular. Este fenómeno se ha observado en otras proteínas de membrana externa sometidas al mismo tratamiento, como es el caso de Prn [30]. Además de mostrar la localización de las proteínas, estos resultados también indican que anticuerpos generados estas proteínas recombinantes son capaces de reconocer a la respectiva proteína nativa en la superficie bacteriana, una condición indispensable si se desea incorporar estos antígenos recombinantes a las vacunas acelulares actuales.

Trabajos recientes señalan la aparición de cepas circulantes deficientes en alguno de los antígenos incluidos en las vacunas [34-36], tal vez como resultado de décadas de vacunación con las mismas formulaciones. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos inmunógenos que se encuentren conservados entre cepas circulantes. En este trabajo se confirmó la conservación de los genes que codifican para AfuA, IRP1-3 y Lip entre cepas aisladas de pacientes con tos convulsa, demostrándose además la expresión de las tres proteínas cuando dichos aislados son cultivados en limitación de hierro.

Como ya se describió en este Trabajo de Tesis, la mayoría de los factores de colonización y virulencia de *B. pertussis* conocidos se encuentran regulados por un sistema de dos componentes, denominado BvgAS, que responde a condiciones de entorno [39]. Así, a través de este sistema, la bacteria es capaz de modular su virulencia desde una fase avirulenta, caracterizada por la ausencia de expresión de los genes regulados positivamente por el sistema BvgAS, hasta una fase virulenta, en la que se expresan la mayoría de los factores de virulencia de este patógeno, entre los que se encuentran aquellos incluidos en las vacunas acelulares actuales. Los estudios que se llevan a cabo en la actualidad dirigidos a la búsqueda de vacunas más efectivas, están orientados al estudio de inmunógenos distintos de los vacunales pero expresados en fase virulenta, o células enteras de bacterias atenuadas pero también en fase virulenta [40-44]. Sin embargo como, ya se mencionó, hay dudas acerca del estado de virulencia de la bacteria infectante tanto por las condiciones

ambientales durante la transmisión [28], como por la limitación de hierro dentro del hospedador que induce un estado de virulencia atenuado (Capítulo 3 de este trabajo de Tesis). En este contexto, es deseable que futuros componentes vacunales se expresen *in vivo* independientemente del estado virulencia de la bacteria. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que *B. pertussis*, cultivada en limitación de hierro, expresa AfuA, IRP1-3 y Lip tanto en fase virulenta como avirulenta. De esta manera, aún si la bacteria ingresa al hospedador en fase avirulenta o intermedia, estas proteínas estarán expresadas y podrán ser blanco de anticuerpos generados por vacunación.

En resumen estos resultados sugieren que AfuA, IRP1-3 y Lip son potenciales antígenos vacunales cuya incorporación a las formulaciones actuales podría contribuir a mejorar su eficiencia.





## 4.4 Conclusiones

IRP1-3 es una proteína dimérica, capaz de unir hierro, inmunogénica, y localizada en la membrana de la bacteria, según predicción.

AfuA, IRP1-3 y Lip se expresan durante la infección y son inmunogénicas en el hombre.

AfuA e IRP1-3 están expuestas en la superficie bacteriana lo que las señala como posibles blancos de opsoninas.

Las formas recombinantes de AfuA y IRP1-3 generan anticuerpos que reconocen la respectiva proteína nativa expuesta en la superficie bacteriana.

Los genes *afuA*, *irp1-3* y *lip* se encuentran altamente conservados entre cepas circulantes y las proteínas son expresadas por dichas cepas cuando se cultivan en limitación de hierro.

Cada una de las tres proteínas se expresa de forma independiente del estado de virulencia de la bacteria.

rLip es una proteína altamente inmunogénica aún en ausencia de adyuvante.

En conjunto, estos resultados señalan a estas proteínas como buenos candidatos para el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales.



## Referencias

- [1] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [2] Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol* 2011 Jul 8.
- [3] Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol* 2012 Aug 24.
- [4] Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996 Jun;60(2):316-41.
- [5] Chen CY, Berish SA, Morse SA, Mietzner TA. The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria* spp. functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol Microbiol* 1993;10(2):311-8.
- [6] Adhikari P, Berish SA, Nowalk AJ, Veraldi KL, Morse SA, Mietzner TA. The fbpABC locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *J Bacteriol* 1996 Apr;178(7):2145-9.
- [7] Khan AG, Shouldice SR, Kirby SD, Yu RH, Tari LW, Schryvers AB. High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from *Haemophilus influenzae* is required for acquiring iron from transferrin. *Biochem J* 2007;404(2):217-25.
- [8] Angerer A, Gaisser S, Braun V. Nucleotide sequences of the sfuA, sfuB, and sfuC genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J Bacteriol* 1990 Feb;172(2):572-8.
- [9] Tom-Yew SA, Cui DT, Bekker EG, Murphy ME. Anion-independent iron coordination by the *Campylobacter jejuni* ferric binding protein. *J Biol Chem* 2005;280(10):9283-90. Epub 2004 Dec 21.
- [10] Schryvers AB, Stojiljkovic I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1999;32(6):1117-23.
- [11] Mietzner TA, Tencza SB, Adhikari P, Vaughan KG, Nowalk AJ. Fe(III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;225:113-35.
- [12] Adhikari P, Kirby SD, Nowalk AJ, Veraldi KL, Schryvers AB, Mietzner TA. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J Biol Chem* 1995;270(42):25142-9.

- [13] Ekins A, Khan AG, Shouldice SR, Schryvers AB. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process. *Biometals* 2004;17(3):235-43.
- [14] Khun HH, Kirby SD, Lee BC. A *Neisseria meningitidis* fbpABC mutant is incapable of using nonheme iron for growth. *Infect Immun* 1998;66(5):2330-6.
- [15] Agiato LA, Dyer DW. Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect Immun* 1992;60(1):117-23.
- [16] Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovich ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 2010 Mar;78(3):907-13.
- [17] Bessler WG, Jung G. Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res Immunol* 1992 Jun;143(5):548-53; discussion 79-80.
- [18] Finke M, Duchene M, Eckhardt A, Domdey H, von Specht BU. Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1990 Jul;58(7):2241-4.
- [19] Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992 Jul;60(7):2855-62.
- [20] Salazar JC, Pope CD, Moore MW, Pope J, Kiely TG, Radolf JD. Lipoprotein-dependent and -independent immune responses to spirochetal infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005 Aug;12(8):949-58.
- [21] Vasselon T, Detmers PA, Charron D, Haziot A. TLR2 recognizes a bacterial lipopeptide through direct binding. *J Immunol* 2004 Dec 15;173(12):7401-5.
- [22] Tom-Yew SA. Characterization of two new classes of periplasmic ferric binding proteins. Tesis Doctoral 2008.
- [23] Chan AC, Doukov TI, Scofield M, Tom-Yew SA, Ramin AB, Mackichan JK, et al. Structure and function of P19, a high-affinity iron transporter of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J*;401(4):590-604. Epub 2010 Jun 30.
- [24] Deka RK, Brautigam CA, Tomson FL, Lumpkins SB, Tomchick DR, Machius M, et al. Crystal structure of the Tp34 (TP0971) lipoprotein of *treponema pallidum*: implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin. *J Biol Chem* 2007;282(8):5944-58. Epub 2006 Dec 27.
- [25] Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234(3):779-815.
- [26] Chan AC, Doukov TI, Scofield M, Tom-Yew SA, Ramin AB, Mackichan JK, et al. Structure and function of P19, a high-affinity iron transporter of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Mol Biol* 2010 Aug 27;401(4):590-604.
- [27] Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol* 2012 Dec;8(12):e1002829.

- [28] Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, Martinez de Tejada G. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* 2005;73(2):748-60.
- [29] Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* 2001;40(3):669-83.
- [30] Brennan MJ, Li ZM, Cowell JL, Bisher ME, Steven AC, Novotny P, et al. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1988 Dec;56(12):3189-95.
- [31] Weaver KD, Gabricevic M, Anderson DS, Adhikari P, Mietzner TA, Crumbliss AL. Role of citrate and phosphate anions in the mechanism of iron(III) sequestration by ferric binding protein: kinetic studies of the formation of the holoprotein of wild-type FbpA and its engineered mutants. *Biochemistry*;49(29):6021-32.
- [32] Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 2011 Feb;79(2):548-61.
- [33] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003;188(5):738-42. Epub 2003 Aug 5.
- [34] Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 2009;27(43):6034-41. Epub 2009 Aug 8.
- [35] Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* 2012 Aug 22.
- [36] Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* 2012;7(2):e31985.
- [37] Gomez JA, Agra C, Ferron L, Powell N, Pintor M, Criado MT, et al. Antigenicity, cross-reactivity and surface exposure of the *Neisseria meningitidis* 37 kDa protein (Fbp). *Vaccine* 1996;14(14):1340-6.
- [38] Shafer WM, Morse SA. Cleavage of the protein III and major iron-regulated protein of *Neisseria gonorrhoeae* by lysosomal cathepsin G. *J Gen Microbiol* 1987 Jan;133(1):155-62.
- [39] Akerley BJ, Miller JF. Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol* 1996 Apr;4(4):141-6.
- [40] Sukumar N, Love CF, Conover MS, Kock ND, Dubey P, Deora R. Active and passive immunizations with *Bordetella* colonization factor A protect mice against respiratory challenge with *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 2009;77(2):885-95. Epub 2008 Dec 8.

- [41] Marr N, Oliver DC, Laurent V, Poolman J, Denoel P, Fernandez RC. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* 2008;26(34):4306-11. Epub 2008 Jun 26.
- [42] Skerry CM, Mahon BP. A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin*;18(2):187-93. Epub 2010 Dec 8.
- [43] Sukumar N, Sloan GP, Conover MS, Love CF, Mattoo S, Kock ND, et al. Cross-species protection mediated by a *Bordetella bronchiseptica* strain lacking antigenic homologs present in acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 2010 May;78(5):2008-16.
- [44] Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Quatannens J, Engle J, Goldman WE, et al. Attenuated *Bordetella pertussis*: new live vaccines for intranasal immunisation. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-54-5.

# Capítulo 5

Evaluación de la capacidad protectora de AfuA, IRP1-3 y Lip







## 5. Evaluación de la capacidad protectora de AfuA, IRP1-3 y Lip

### 5.1 Introducción

Como ya se ha mencionado, el mejor control de la tos convulsa, y la eventual erradicación de la enfermedad, requiere el desarrollo de nuevas y mejores vacunas. Las diferencias fenotípicas [1, 2] y genotípicas [3-6] entre la bacteria infectante y aquellas que componen las vacunas celulares o los antígenos incluidos en las acelulares se encuentran entre las principales causas de la baja eficiencia de las vacunas actuales. A esto se suma la caída de la protección a los pocos años de vacunación. La situación epidemiológica actual con adolescentes y adultos infectados, principal fuente de contagio para infantes, y recientemente incluidos en los planes de vacunación requiere de mejores vacunas acelulares, capaces de prevenir también la colonización inicial para evitar el establecimiento de reservorios y la continua circulación de este patógeno.

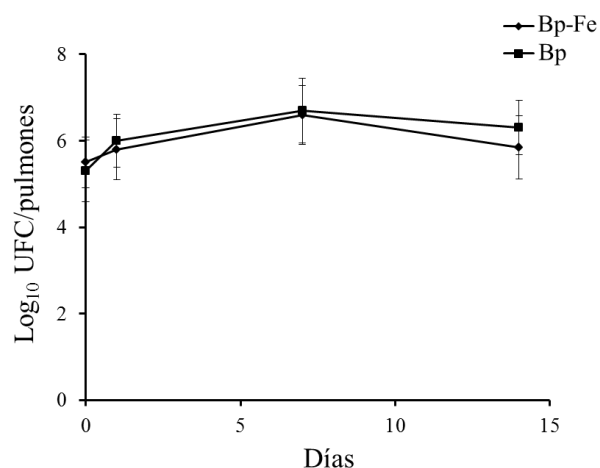
Como ya se mencionó, como estrategia para el hallazgo de nuevos inmunógenos protectores basamos nuestra búsqueda en la identificación de proteínas inmunogénicas expresadas por el fenotipo infectante independientemente de la fase de virulencia y en lo posible involucradas en alguna función vital que asegure su expresión en condiciones infectantes.. En el Capítulo 4 mostramos que sueros de individuos infectados presentan elevado título de anticuerpos capaces de reconocer dos proteínas relacionadas con la captura de hierro por *B. pertussis*, denominadas AfuA e IRP1-3. La inmunogenicidad de estas proteínas y su expresión durante la infección las señalan como posibles nuevos antígenos a ser incluidos en nuevas formulaciones vacunales. En el Capítulo 4 también demostramos que los sueros de individuos que padecieron de tos convulsa presentan alto título de anticuerpos dirigidos contra una lipoproteína, que denominamos Lip, cuya expresión también se ve inducida bajo limitación de hierro, y que además esta proteína resulta inmunogénica aún en ausencia de adyuvantes. Dado que el adyuvante con el que se formula una vacuna influye en el tipo y duración de la respuesta inmune generada, el estudio de las propiedades adyuvantes de Lip podría tener relevancia en el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales contra *B. pertussis*.

En el presente Capítulo, evaluamos la capacidad de las proteínas AfuA, IRP1-3 y Lip recombinantes para conferir protección en el modelo de infección de ratón tanto en formulaciones monovalentes como en combinación con la vacuna Pa de tres componentes actualmente en uso.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 Puesta a punto del modelo de infección de ratones con *B. pertussis* limitada en hierro

Para poder evaluar la capacidad protectora de inmunógenos que se encuentran expresados en limitación de hierro primero debimos conocer la cinética de infección de este fenotipo. Debido a que este modelo no está descrito en bibliografía, previo a la evaluación de la capacidad protectora de los antígenos en estudio debimos caracterizar el desarrollo de la infección de ratones con *B. pertussis* limitada en hierro. Con este objetivo, grupos de ratones BALB/c se infectaron con la bacteria cultivada bajo limitación de hierro o en exceso de hierro (control). Dos horas después de la infección se sacrificaron 5 ratones de cada grupo, se extrajeron los pulmones y se determinó la carga bacteriana mediante recuento en placa. En la Figura 1 puede observarse que el nivel de colonización inicial de *B. pertussis* limitada en hierro no muestra diferencias significativas con el que presenta la bacteria cuando se cultiva en exceso de hierro. Para seguir el curso de la infección se determinó la carga bacteriana pulmonar los días 1, 7 y 14 (Fig. 1). Como puede observarse, el desarrollo de la infección es similar para los dos fenotipos bacterianos, y si bien se observó una mayor carga bacteriana pulmonar al día 14 en los ratones infectados con la bacteria limitada en hierro respecto de los infectados con la bacteria cultivada en exceso de hierro, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Consistente con la capacidad de los ratones para limitar la infección observada previamente en este modelo [7], las unidades formadoras de colonia (UFC) por pulmón comienza a descender al día 14.



**Figura 1. Modelo de infección de ratón con *B. pertussis* limitada en hierro.** Grupos de 20 ratones fueron infectados con *B. pertussis* cultivada en exceso (Bp) o bajo limitación de hierro (Bp-Fe) el día 0. Se tomaron muestras de pulmones de ratones (n=5) los días 0, 1, 7 y 14 post infección, se disgregaron y se determinó UFC mediante recuento en placa. La figura muestra la media  $\pm$  DE del Log UFC/pulmones para cada grupo en cada uno de los días evaluados.

### 5.2.2 Evaluación de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes AfuA e IRP1-3

La capacidad protectora de estas proteínas *in vivo* fue evaluada mediante ensayos de protección activa en ratones BALB/c. Para ello, grupos de ratones se inmunizaron con cada proteína recombinante formulada en adyuvante de Freund (AF) los días 0 y 19. Además, un grupo de ratones se inmunizó con una vacuna formulada con células de *B. pertussis* inactivadas por calor en adyuvante de aluminio (Bp/AAl). Debido a que está ampliamente demostrado que esta vacuna es capaz de conferir protección en el modelo de infección de ratón utilizado [8], este grupo se utilizó como control positivo del ensayo de protección. En este ensayo también se incluyó un grupo de ratones inmunizados con una vacuna formulada con células de la bacteria cultivada en limitación de hierro inactivadas por calor en adyuvante de aluminio (Bp-Fe/AAl), con el objetivo de evaluar potenciales diferencias entre en el nivel de protección conferido por vacunas de células enteras compuestas de bacterias cultivadas en exceso o en limitación de hierro. Como control negativo para las

vacunas formuladas con las proteínas recombinantes se utilizó un grupo de ratones inmunizados con AF, mientras que para los grupos inmunizados con vacunas celulares los ratones del grupo control se inmunizaron con adyuvante de aluminio. Todos los grupos fueron inmunizados siguiendo el mismo esquema de inmunización descrito arriba. Quince días después de la segunda dosis, los ratones se desafiaron por instilación con *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro. El recuento de bacterias en pulmón se utilizó para evaluar la capacidad protectora de las vacunas. Para ello tres días post-desafío se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) presente en los pulmones de los ratones de cada grupo. El análisis estadístico (ANOVA) del conjunto de datos de UFC/pulmones para cada grupo de ratones indica que la inmunización con cada una de las proteínas recombinantes en formulaciones monovalentes genera un nivel significativo de protección contra la infección por *B. pertussis*. En la Tabla 1 también puede observarse que la inmunización con bacterias enteras cultivadas en exceso o limitación de hierro no presenta diferencias significativas en el nivel de protección conferido.

**Tabla 1.** Protección contra la infección por *B. pertussis* conferida por inmunización con rAfuA o rIRP1-3

Vacuna	Log UFC en pulmones <sup>a</sup>	Unidades de Protección <sup>b</sup>
rAfuA/AF	6,05 ± 0,52 <sup>c</sup>	1,07
rIRP1-3/AF	6,61 ± 0,10 <sup>c</sup>	0,51
Bp/AAI	3,49 ± 0,43 <sup>c</sup>	3,40
Bp-Fe/AAI	3,54 ± 0,54 <sup>c</sup>	3,35
PBS/AF	7,12 ± 0,10	---
PBS/AAI	6,89 ± 0,30	---
PBS	6,98 ± 0,62	---

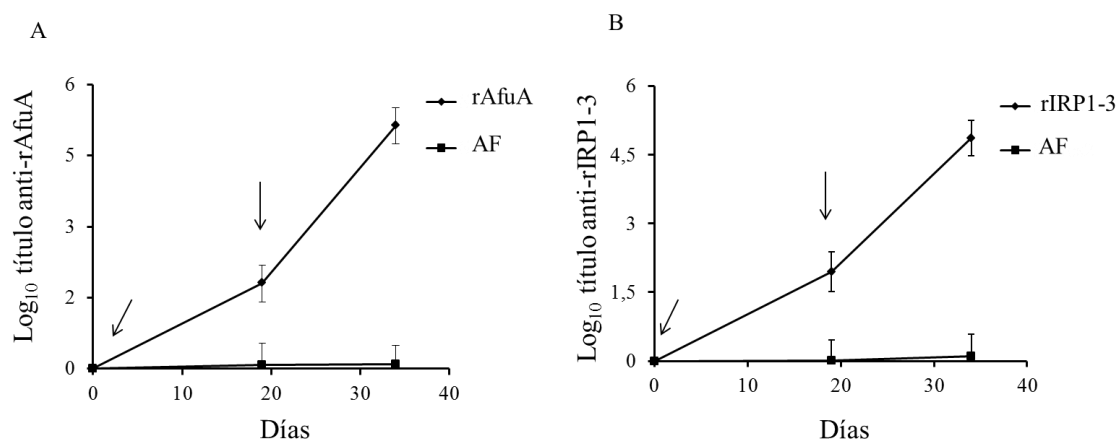
<sup>a</sup> La carga bacteriana es representada como la media del Log UFC ± DE para cada grupo

<sup>b</sup> Las unidades de protección fueron obtenidas mediante la substracción de la media del Log UFC del grupo vacunado, ya sea con cada una de las proteínas recombinantes o con la vacuna celular, a la media del Log UFC del respectivo grupo control (PBS/AF o PBS/AAI)

<sup>c</sup> Significativamente diferente del respectivo grupo control (p<0,05)

### 5.2.3 Estudio de la respuesta humoral generada por inmunización con rAfuA o con rIRP1-3

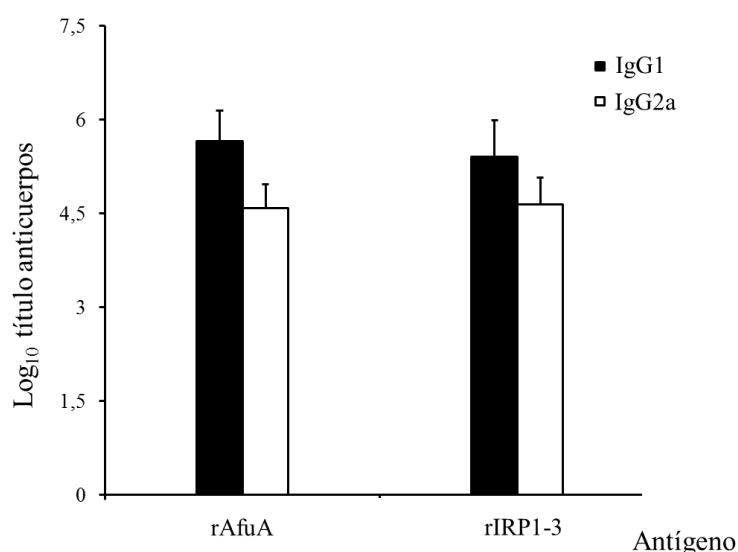
En ensayos descritos en el Capítulo 4 se observó que la inmunización con rAfuA o rIRP1-3 genera anticuerpos específicos contra la proteína respectiva. Con el fin de caracterizar mejor la respuesta humoral generada por inmunización con las proteínas en estudio, grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados con rAfuA o rIRP1-3 en adyuvante de Freund (AF) completo y recibieron una dosis de refuerzo el día 19 con la respectiva proteína formulada en AF incompleto. Se tomaron muestras de suero los días 0, 19 y 34 para evaluar la presencia de anticuerpos. El título de inmunoglobulina G (IgG) específica dirigida contra cada proteína fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con la respectiva proteína recombinante. Como puede observarse en la Figura 2, la primer dosis cada vacuna genera un título moderado de anticuerpos específicos, el cual aumenta significativamente luego de la dosis refuerzo (Fig. 2A y 2B). Como control negativo se utilizaron sueros de ratones inmunizados con PBS y ratones inmunizados con adyuvante solamente. Debido a que no hubo diferencias en los títulos de ambos controles negativos, en la Figura 2 sólo se muestran los títulos determinados en los sueros de los ratones inmunizados con AF.



**Figura 2. Título de anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 generados por vacunación. Grupos**

de 6 ratones fueron inmunizados los días 0 y 19 con la correspondiente proteína recombinante o con AF. Los días 0, 19 y 34 se obtuvieron muestras de suero. Curva de titulación del título de anticuerpos anti-rAfuA (**A**) o anti-rIRP1-3 (**B**) fue determinada mediante ensayos de ELISA a lo largo del esquema de inoculación. Los resultados muestran la media  $\pm$  DE.

En la Figura 3 se muestra la distribución de isotipos IgG1 e IgG2a específicos dirigidos contra cada proteína determinados en los sueros correspondientes al día 34 post-inmunización mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con la proteína respectiva. Sueros de ratones inmunizados con adyuvante solo sirvieron como control negativo en estos ensayos. Como puede observarse, tanto los ratones inmunizados con rAfuA/AF como los inmunizados con rIRP1-3/AF presentaron una relación balanceada de IgG1 e IgG2a (Fig. 3).

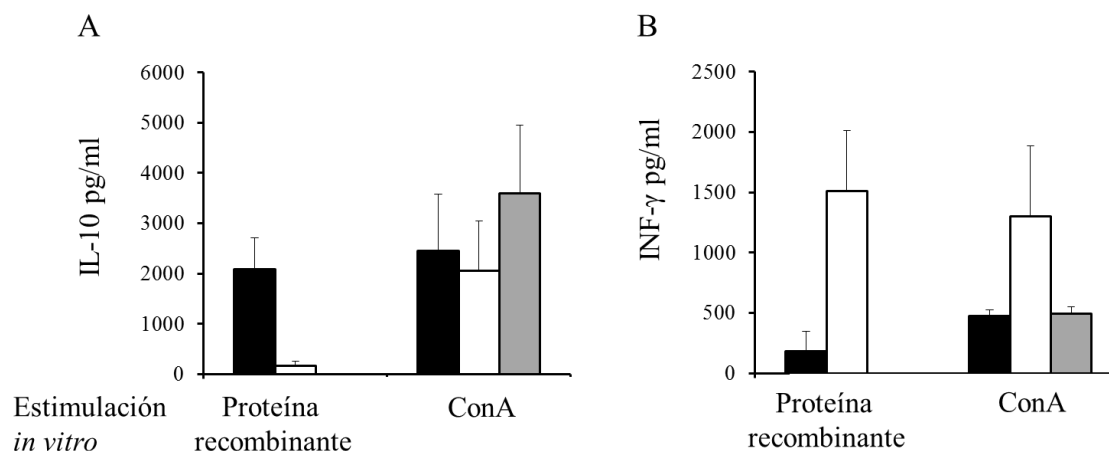


**Figura 3. Distribución de isotipos IgG1 e IgG2a en sueros de ratones inmunizados con rAfuA o rIRP1-3.** Grupos de 6 ratones fueron inmunizados los días 0 y 19 con la correspondiente proteína recombinante. 15 días después de la segunda inmunización se determinó el título de IgG1 e IgG2a mediante ensayos de ELISA (media  $\pm$  DE). La figura muestra la distribución de isotipo de anticuerpos IgG específicos para cada antígeno.

#### 5.2.4 Evaluación de la respuesta inmune celular generada por inmunización con rAfuA o con rIRP1-3

Estudios previos indican que tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células son necesarias para controlar la infección por *B. pertussis* [9]. Para una mejor caracterización del tipo de respuesta inmune generada por inmunización con AfuA e IRP1-3, examinamos el perfil de citoquinas secretadas por los esplenocitos de los ratones inmunizados. Para ello se extrajo el bazo de los ratones inmunizados con rAfuA/AF, rIRP1-3/AF o AF solo (grupo control), y los esplenocitos aislados fueron estimulados *in vitro* con la respectiva proteína recombinante, con medio de cultivo solo (control negativo) o con ConA (control positivo). Luego de 72 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la producción de IL-10 e INF- $\gamma$ , marcadores de respuesta Th2 y Th1, respectivamente. Los esplenocitos de los tres grupos de ratones produjeron ante el estímulo con ConA niveles de IL-10 e INF- $\gamma$  significativamente mayores que los niveles generados por esplenocitos estimulados con DMEM (grupo control) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A y 4B), mientras que en presencia de DMEM ninguno de los grupos produjo niveles detectables de ninguna de las dos citoquinas evaluadas (datos no mostrados). Los sobrenadantes de los esplenocitos de ratones inmunizados con rIRP1-3/AF estimulados con la respectiva proteína recombinante mostraron altos niveles de IL-10 (Fig. 4A) y moderados niveles de INF- $\gamma$  (Fig. 4B) significativamente mayores que los niveles generados por esplenocitos estimulados con DMEM (grupo control) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los esplenocitos de ratones inmunizados con rAfuA estimulados con la proteína recombinante produjeron niveles de INF- $\gamma$  significativamente mayores que los niveles generados por esplenocitos estimulados con DMEM ( $p < 0.05$ ), y bajos niveles de IL-10 (Fig. 4A y 4B). Estos resultados indican que la inmunización con rAfuA/AF conduce a una respuesta inmune con un fuerte componente tipo Th1, mientras que la inmunización con rIRP1-3/AF genera principalmente una respuesta Th2, con una leve, aunque significativa, contribución Th1.



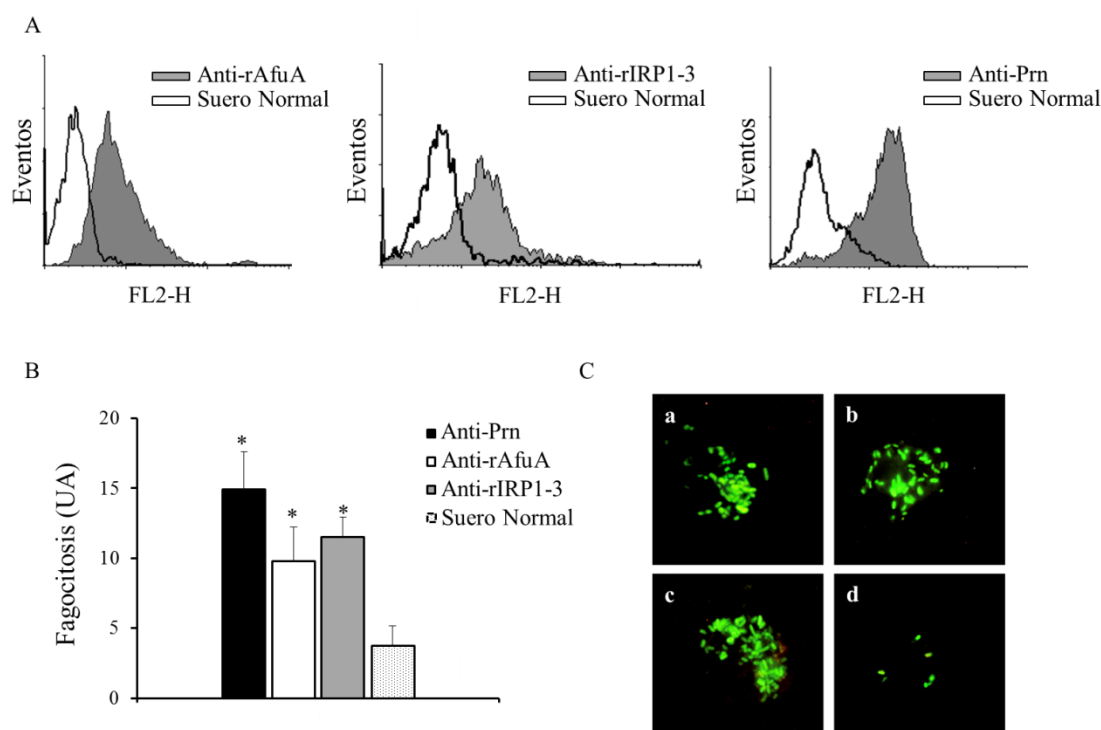


**Figura 4. Perfil de citoquinas producido por inmunización con rAfua o rIRP1-3.** Células de bazo extraídas de grupos de 6 ratones inmunizados con rAfua (barras blancas), rIRP1-3 (barras negras) o AF (barras grises) fueron estimuladas in vitro con la respectiva proteína recombinante o ConA. Transcurridas 72 hs se determinó INF-γ o IL-10 en el sobrenadante. La figura muestra la media  $\pm$  DE.

### 5.2.5 Determinación de la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos anti-rAfua y anti-rIRP1-3

Anticuerpos que reconocen proteínas en la superficie bacteriana pueden actuar como opsoninas favoreciendo la fagocitosis y destrucción de los microorganismos por células del sistema inmune, como neutrófilos y macrófagos. Estudios realizados por nuestro grupo demuestran que la opsonización mediada por anticuerpos específicos es crucial para inducir actividad celular bactericida contra *B. pertussis* [10, 11]. Dado que los resultados de los ensayos de ELISA con células de *B. pertussis* limitada en hierro descritos en el Capítulo 4 sugieren que tanto Afua como IRP1-3 se encuentran expuestas en la superficie bacteriana, evaluamos su potencialidad para actuar como blanco de opsoninas. Bacterias cultivadas en limitación de hierro se incubaron con anticuerpos anti-rAfua o anti-rIRP1-3 específicos a 37°C en agitación y se analizó la unión de los mismos a la superficie bacteriana mediante

citometría de flujo. Como control positivo de la opsonización, se incluyó un suero anti-Prn. La figura 5A muestra que tanto los anticuerpos anti-rAfuA como los anticuerpos anti-rIRP1-3 son capaces de opsonizar eficientemente la bacteria limitada en hierro, resultados que sustentan la exposición de estas proteínas en la superficie de la bacteria. La capacidad de estos anticuerpos de promover la fagocitosis bacteriana por neutrófilos humanos se evaluó en paralelo para anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 y anti-Prn (control positivo). En la Figura 5B y C puede observarse que tanto anti-rAfuA, como anti-rIRP1-3 promueven eficientemente la fagocitosis bacteriana.



**Figura 5. Capacidad de anticuerpos anti-rAfuA o anti-rIRP1-3 de promover la fagocitosis de *B. pertussis* por neutrófilos.** A. *B. pertussis* cultivada en ausencia de hierro fue incubada con suero anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-Prn, o suero normal de ratón durante 30 min a 37°C. Luego de los correspondientes lavados, las bacterias fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE durante 30 min a 4°C, lavadas, fijadas y analizadas por citometría de flujo. La

figura muestra histogramas representativos de tres experimentos independientes. **B.** GFP-*B. pertussis* opsonizada con suero anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, anti-Prn o suero normal de ratón, fue incubada con neutrófilos humanos durante 10 min a 37°C. Los neutrófilos fueron lavados y divididos en dos alícuotas, una mantenida a 4°C (nivel inicial de adhesión) y la otra incubada a 37°C 40 min para permitir la internalización. *B. pertussis*-IgG opsonizada unida a la superficie fue detectada en ambas alícuotas mediante la adición de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE. La fagocitosis se expresa como nivel fluorescencia verde asociada a PMN debido a las bacterias fagocitadas. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La fagocitosis de las bacterias opsonizadas con sueros de ratones inmunizados difiere significativamente de la observada para bacterias opsonizadas con sueros normal de ratones (\* $p < 0,05$ ). UA: Unidades arbitrarias. **C.** Microscopía de fluorescencia de la fagocitosis de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro opsonizadas con anticuerpos anti-rIRP1-3 (panel a), anti-rAfuA (panel b), anti-Prn (panel c) y suero normal (panel d). En la figura se muestran fotos representativas de uno de tres experimentos independientes.

#### 5.2.6 Evaluación de la contribución del agregado de rAfuA y de rIRP1-3 a la protección conferida por la vacuna Pa de tres componentes

A continuación, evaluamos la capacidad protectora de la vacuna acelular de tres componentes comercial DTPa *Infanrix*<sup>TM</sup> (FHA, PT, Prn) en combinación con rAfuA (Pa<sub>4A</sub>), rIRP1-3 (Pa<sub>4I</sub>), o con ambas proteínas recombinantes (Pa<sub>5AI</sub>). En la tabla 2 se puede observar que tanto el agregado de rAfuA como el de rIRP1-3 por separado conduce a un aumento significativo en el nivel de protección generado por la vacuna DTPa sola ( $P < 0,01$ ). El agregado de ambas proteínas recombinantes generó un aumento aún mayor que en el nivel de protección contra la infección con *B. pertussis* que el conferido por cada una de las proteínas por separado (Tabla 2).

**Tabla 2.** Protección contra la infección por *B. pertussis* conferida por inmunización con Pa<sub>4A</sub>, Pa<sub>4I</sub> y Pa<sub>5AI</sub>

Vacuna	Log UFC en pulmones <sup>a</sup>	Unidades de Protección <sup>b</sup>
--------	----------------------------------	-------------------------------------

Pa <sub>4A</sub>	3,07 ± 0,36 <sup>c,d</sup>	3,82
Pa <sub>4I</sub>	2,93 ± 0,53 <sup>c,d</sup>	3,96
Pa <sub>5AI</sub>	2,74 ± 0,38 <sup>c,d</sup>	4,15
Pa	3,59 ± 0,38 <sup>c</sup>	3,30
PBS/AAl	6,89 ± 0,30	---

<sup>a</sup> La carga bacteriana es representada como la media del Log UFC ± DE para cada grupo

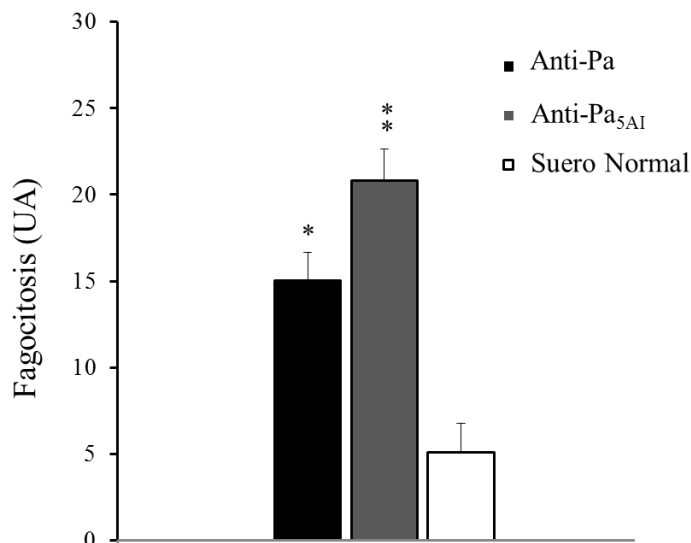
<sup>b</sup> Las unidades de protección fueron obtenidas mediante la substracción de la media del Log UFC del grupo vacunado con Pa, Pa<sub>4A</sub>, Pa<sub>4I</sub> o Pa<sub>5AI</sub>, a la media del Log UFC del grupo control (PBS/AAl)

<sup>c</sup> Significativamente diferente del grupo control (PBS/AAl) (p<0,01)

<sup>d</sup> Significativamente diferente del grupo inmunizado con la vacuna Pa (p<0,01)

### 5.2.7 Evaluación de la capacidad opsonofagocítica de sueros obtenidos por inmunización con Pa<sub>5AI</sub>

Como se mencionó anteriormente, el único antígeno presente en la vacuna acelular Pa capaz de generar anticuerpos con actividad opsonofagocítica, crítica para la limitación de la infección con *B. pertussis*, es Prn [10]. Dado que ensayos realizados en este Capítulo demostraron que anticuerpos dirigidos contra rAfuA y rIRP1-3 presentan este tipo de actividad, evaluamos si la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas en los sueros de ratones inmunizados con Pa<sub>5AI</sub> mejora el nivel de fagocitosis, lo que podría explicar el mayor nivel de protección conferido por esta vacuna. Para ello, *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro opsonizada con suero anti-Pa<sub>5AI</sub> o Pa se incubó con neutrófilos a 37°C en agitación para permitir la internalización de las bacterias. Como puede observarse en la Figura 5, el agregado de las proteínas recombinantes a la vacuna acelular genera nuevos anticuerpos que contribuyen a la fagocitosis de *B. pertussis* por neutrófilos humanos.

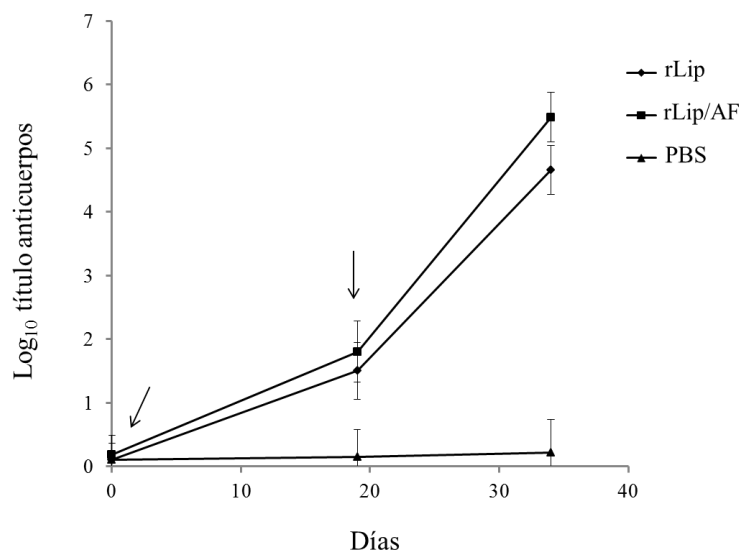


**Figura 5. Efecto del agregado de rAfua y rIRP1-3 a la vacuna Pa en la opsonofagocitosis de *B. pertussis* por neutrófilos.** GFP-*B. pertussis* opsonizada con suero anti-Pa (barra negra), anti-Pa<sub>5AI</sub> (barra gris) o suero normal de ratón (barra blanca), fue incubada con neutrófilos humanos durante 10 min a 37°C. Los neutrófilos fueron lavados y divididos en dos alícuotas, una mantenida a 4°C (nivel inicial de adhesión) y la otra incubada a 37°C 40 min para permitir la internalización. *B. pertussis*-IgG opsonizada unida a la superficie fue detectada en ambas alícuotas mediante la adición de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE. La fagocitosis se expresa como fluorescencia verde asociada a PMN debido a las bacterias fagocitadas. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La fagocitosis de las bacterias opsonizadas con sueros de ratones inmunizados difiere significativamente de la observada para bacterias opsonizadas con suero normal de ratón (\* $p < 0,05$ ). La fagocitosis de las bacterias opsonizadas con sueros de ratones inmunizados con Pa<sub>5AI</sub> difiere significativamente de la observada para bacterias opsonizadas con sueros de ratones inmunizados con Pa (\*\* $p < 0,05$ ). UA: Unidades Arbitrarias.

### 5.2.8 Estudio de capacidad protectora de rLip

Se evaluó el perfil de producción de IgG anti-Lip en grupos de ratones inmunizados con ésta proteína sola o formulada con adyuvante con el mismo esquema de inmunización empleado para las otras dos proteínas. La Figura 6 muestra que al día 19, los ratones inmunizados con rLip sola o en presencia de adyuvante muestran títulos similares contra

ésta proteína. Luego de la dosis de refuerzo el título de ambos grupos aumentó significativamente (Fig. 6).



**Figura 6. Título de anticuerpos anti-rLip generados por vacunación con rLip/AF o rLip.**

Grupos de 6 ratones fueron inmunizados los días 0 y 19 con rLip en PBS (rLip), rLip con AF (rLip/AF) o con PBS. Los días 0, 19 y 34 se obtuvieron muestras de suero. El título de anticuerpos para cada suero se determinó mediante ensayos de ELISA a lo largo del esquema de inoculación. Los resultados muestran la media  $\pm$  DE.

Para evaluar si estos anticuerpos eran capaces de conferir protección contra la infección con *B. pertussis*, ratones BALB/c se inmunizaron con vacunas formuladas con la proteína en PBS (rLip). También se evaluó la capacidad protectora de la lipoproteína en presencia de adyuvante de Freund (rLip/AF). Se incluyó un grupo de ratones inmunizados con bacterias cultivadas en ausencia de hierro inactivadas por calor en adyuvante de aluminio (Bp-Fe/Al) como control positivo. Grupos de ratones inmunizados con PBS o PBS/AF fueron incluidos como controles negativos. Los ratones fueron inmunizados siguiendo los mismos esquemas de vacunación descritos en los ensayos de protección anteriores y 15 días después de la segunda dosis fueron desafiados con *B. pertussis*.

cultivada en limitación de hierro. La carga bacteriana pulmonar determinada tres después de la infección se utilizó como una medida de la protección. Los ratones inmunizados con la proteína recombinante en ausencia o en presencia de adyuvante mostraron poca disminución en la carga pulmonar que no fue significativamente diferente de la observada en el grupo inmunizado con PBS o PBS/AF (control negativo) (Tabla 3), indicando que rLip no brinda protección en formulaciones monovalentes a pesar de generar un alto título de anticuerpos.

**Tabla 3.** Protección contra la infección por *B. pertussis* conferida por inmunización con rLip en presencia o en ausencia de adyuvantes.

Vacuna	Log UFC en pulmones <sup>a</sup>	Unidades de Protección <sup>b</sup>
rLip/AF	6,87 ± 0,68	0,10
rLip/PBS	6,98 ± 0,21	0,05
Bp-Fe/AAl	3,83 ± 0,58 <sup>c</sup>	3,29
PBS/AAL	7,12 ± 0,54	---
PBS	7,03 ± 0,35	---
PBS/AF	6,97 ± 0,59	---

<sup>a</sup> La carga bacteriana es representada como la media del Log UFC ± DE para cada grupo

<sup>b</sup> Las unidades de protección fueron obtenidas mediante la substracción de la media del Log UFC del grupo vacunado, ya sea con cada una de las proteínas recombinantes o con la vacuna celular, a la media del Log UFC del respectivo grupo control (PBS/AF, PBS/AAl o PBS)

<sup>c</sup> Significativamente diferente del respectivo grupo control (p<0,05)





### 5.3 Discusión

Como ya se ha mencionado todos los intentos de mejorar las formulaciones actuales incluyen antígenos regulados conjuntamente con todos los factores de virulencia o bacterias que estén en esta fase, aunque existen dudas acerca de si estos antígenos estarán expresados en el fenotipo infectante. Nuestra estrategia de búsqueda de nuevos componente vacunales se basó en la hipótesis de que proteínas inmunogénicas cuya expresión se induzca en condiciones de infección podrían ser buenos candidatos. Si además estas proteínas fueran necesarias durante la colonización, anticuerpos dirigidos contra ellas podrían bloquear sistemas vitales lo cual eventualmente redundaría en mayor protección. Así, decidimos estudiar el proteoma de *B. pertussis* inducido por limitación de hierro, una de las condiciones nutricionales que la bacteria debe enfrentar dentro del hospedador, y evaluar por análisis serológico del proteoma cual/es proteína/s inducidas en estas condiciones mostraban reactividad con sueros de individuos infectados. De esta forma, mediante inmunoproteómica identificamos un conjunto de proteínas inmunogénicas sobre-expresadas por la bacteria cultivada en limitación de hierro [12]. La inmunoproteómica ha sido aplicada con éxito para el descubrimiento de nuevos antígenos de muchos patógenos bacterianos, como por ejemplo *Helicobacter pylori* [13, 14], *Staphylococcus aureus* [15], *Shigella flexneri* [16], entre otros. Del grupo de proteínas diferencialmente expresadas en esa condición de cultivo que mostraron reactividad positiva con sueros de infectados seleccionamos tres para su evaluación. Dos de ellas por su localización en el subproteoma de membrana externa y posible rol en la captura de hierro *in vivo*, y la otra por su potencialidad como inductor de inmunidad celular y capacidad adyuvante. En el Capítulo 4 se demostró que estas proteínas presentan un conjunto de características que las señalan como buenos candidatos vacunales.

Los resultados mostrados en este Capítulo indican que la inmunización de ratones con rAfuA o con rIRP1-3 resulta en un aumento significativo en el título de anticuerpos específicos dirigidos contra estas proteínas. Los anticuerpos pueden ser protectores de distintas maneras, neutralizando toxinas, interfiriendo con la adhesión inicial a epitelio, bloqueando alguna función vital para la bacteria, o favoreciendo la captura y destrucción del patógeno por macrófagos y neutrófilos. Por las características que presentan estas

proteínas, anticuerpos dirigidos contra ellas, podrían presentar alguna de las dos últimas actividades biológicas mencionadas. Hace unos años nuestro grupo identificó a la fagocitosis mediada por anticuerpos como un mecanismo clave para la inmunoeeliminación de *B. pertussis* [11]. Este es un patógeno resistente a la acción de complemento y en ausencia de anticuerpos opsonizantes, tanto la adhesión de la bacteria a neutrófilos humanos como la fagocitosis se ven drásticamente disminuidas. No hay activación celular por interacción innata con *B. pertussis*, y las pocas bacterias que son fagocitadas en estas condiciones inhiben su propio tráfico a lisosomas y permanecen vivas dentro de las células [11]. Observamos este mismo efecto en macrófagos, dentro de los cuales además la bacteria es capaz de permanecer viable varios días e incluso replicar [17], lo cual eventualmente permitiría el establecimiento de nichos de persistencia intracelular. Entre los antígenos incluidos en las vacunas acelulares actuales, solo Prn es capaz de generar anticuerpos con actividad opsonofagocítica [10]. El surgimiento de cepas circulantes con formas polimórficas distintas de la vacunal en todas partes del mundo [5], y más recientemente, cepas que carecen de la expresión de esta proteína [3, 4, 6] indican la necesidad de hallar nuevos inmunógenos que cumplan con esta característica. En el Capítulo 4 del presente trabajo de Tesis, se demostró que tanto AfuA como IRP1-3 se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y que anticuerpos generados por inmunización con cada una de las proteínas recombinantes son capaces de reconocer a la respectiva proteína nativa en la bacteria viva en ensayos de ELISA. Sin embargo, si bien una proteína posible blanco de opsoninas debe encontrarse expuesta en la superficie bacteriana, esta característica no asegura que anticuerpos dirigidos contra la misma promuevan la fagocitosis. En este Capítulo, mediante ensayos de opsonofagocitosis realizados en suspensión se demostró que los anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 son capaces de opsonizar a *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro, e inducir un nivel de fagocitosis comparable a los anticuerpos anti-Prn.

En respuesta a la inmunización con un antígeno se puede generar dos tipos de células T colaboradoras (Th), Th1 y Th2, definidas en base al patrón de citoquinas que secretan [18]. La respuesta tipo Th1, inductora de respuesta inmune celular, se caracteriza por la presencia de altos niveles de INF- $\gamma$  y un predominio de isotipo de inmunoglobulina IgG2a, en tanto que la respuesta tipo Th2, inductora de respuesta inmune humoral, se

caracteriza por la presencia de altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 y una mayor producción de IgG1. En el caso particular de *B. pertussis* ambos tipos de respuesta, Th1 y Th2, parecen ser necesarios para generar protección [19-23]. Muchos parámetros influyen en la subclase de IgG generada en respuesta a la inmunización con proteínas, entre ellos la cepa de ratón y el adyuvante utilizados, e incluso estructuras intrínsecas de la propia proteína. El análisis de isotipo de anticuerpos producidos por inmunización con rIRP1-3/AF reveló la producción de los isotipos IgG1 e IgG2a, característicos de la respuesta Th2 y Th1, respectivamente. El estímulo de células de bazo de los ratones inmunizados con la proteína recombinante condujo a la producción de altos niveles de IL-10, como así también a la secreción de moderados niveles de INF- $\gamma$  sugiriendo que la inmunización con rIRP1-3 genera respuesta inmune con un fuerte componente Th2 y una contribución de tipo Th1 moderada. Estos resultados indican que la inmunización con rIRP1-3 desencadenaría una respuesta inmune principalmente mediada por anticuerpos. Por el contrario, el estudio de citoquinas secretadas por células de bazo de ratones inmunizados con rAfuA mostró una alta producción de INF- $\gamma$  y niveles bajos de IL-10. Sin embargo, el análisis del perfil de isotipos reveló la producción de IgG2a así como también IgG1. Si bien estos resultados a primera vista parecen inconsistentes, la presencia de anticuerpos IgG1 anti-rAfuA no necesariamente indica una respuesta inmune tipo Th2. Faquim-Mauro y colaboradores demostraron que existen dos tipos de anticuerpos IgG1 funcionalmente distintos en ratones: un tipo de IgG1 presenta actividad anafiláctica y su síntesis es dependiente de IL-4, mientras que el otro tipo de anticuerpos carece de actividad y su síntesis está estimulada por IL-12 e INF- $\gamma$  [24]. Incluso ha sido demostrado que los adyuvantes pueden modular el nivel de los distintos tipos de anticuerpos IgG1 producidos en respuesta a un antígeno en particular [25]. Así, los anticuerpos IgG1 hallados en el suero de los ratones inmunizados con rAfuA podrían pertenecer al segundo tipo de anticuerpos, lo que concuerda con los altos niveles de INF- $\gamma$  observados. Cabe destacar que la cepa de ratón utilizada en estos experimentos desarrolla preferencialmente una respuesta tipo Th2 [26], por lo que la producción de INF- $\gamma$  en respuesta a la inmunización con rAfuA y, aunque en menor medida, con rIRP1-3 señala la potencialidad de estos antígenos de desencadenar una respuesta mediada por células, importante para la protección contra *B. pertussis*.

Si bien AfuA e IRP1-3 generan protección contra la infección con *B. pertussis*, los ensayos de protección de vacunas celulares formuladas con bacterias cultivadas en exceso o en limitación de hierro, no mostraron diferencias en el nivel de protección conferido. Esto parecería indicar que la cantidad de antígenos presentes en las células enteras, donde tal vez el LPS por sus características represente uno de los más importantes, enmascara la contribución a la protección que AfuA e IRP1-3, o incluso la que otros antígenos expresados por el fenotipo limitado en hierro de la bacteria pudieran aportar. Por el contrario, las vacunas acelulares están formuladas con un número pequeño y definido de antígenos, por lo que el agregado de nuevos inmunógenos sí podría mejorar la protección conferida por estas vacunas, más aún si estos inmunógenos se encuentran expresados por la bacteria al momento de la infección. En efecto nuestros resultados muestran que el agregado de cada una de estas proteínas a la vacuna Pa trivalente conduce a un aumento significativo en el nivel de protección de la vacuna. Además, esta contribución se acentuó cuando las dos proteínas juntas fueron agregadas a la vacuna acelular. Según pudimos observar, tanto AfuA como IRP1-3 son capaces de generar anticuerpos opsonizantes, por lo que el aumento en la protección conferida por inmunización con esta vacuna de 5 componentes podría deberse a la generación de nuevas opsoninas que contribuyan a la fagocitosis de la bacteria y de esta forma a la inmunoeliminación y control de la infección. Nuestros resultados parecen sugerir que este sería uno de los mecanismos. Sin embargo no pueden excluirse contribuciones de otro tipo. Por ejemplo, en el caso de AfuA, dado que la proteína es necesaria para la captura de hierro a partir de sideróforos [27], anticuerpos dirigidos contra ella podrían interferir con la adquisición de este nutriente. De cualquier manera, estos resultados demuestran que tanto AfuA como IRP1-3 podrían ser buenos candidatos vacunales.

En lo que se refiere a la tercera proteína estudiada, Lip, ensayos en ratones realizados en este estudio demuestran que la inmunización con la lipoproteína en ausencia de adyuvante genera alto título de anticuerpos anti-rLip específicos en el suero de los ratones. Sin embargo, la inmunización con esta proteína en formulaciones monovalentes, tanto en presencia como en ausencia de adyuvante, no confiere protección contra la infección intranasal con *B. pertussis*. A pesar de esta última observación, debido a que el uso de lipoproteínas como adyuvantes promueven el desarrollo de una respuesta inmune

mediada por células [28], este antígeno está siendo actualmente evaluado en combinación con los antígenos de las vacunas acelulares en estudio en este trabajo de Tesis.



## 5.4 Conclusiones

Los resultados descritos en este Capítulo señalan a AfuA e IRP1-3 como posibles candidatos vacunales.

Tanto AfuA como IRP1-3 son proteínas muy inmunogénicas, inductoras de anticuerpos con actividad opsonizantes y cierto nivel de inmunidad celular.

Ambas proteínas son capaces de montar una respuesta inmune protectora contra *B. pertussis* en modelos animales de infección, aun en formulaciones monovalentes.

El agregado de cada una de estas proteínas, de forma individual o en conjunto, conduce a un aumento en el nivel de protección conferido por las vacunas acelulares en uso.

Si bien la inmunización con Lip no confiere protección contra la infección, es capaz de generar alto título de anticuerpos en ausencia de adyuvantes, por lo que su agregado a las vacunas actuales podría mejorar la respuesta inmune generada.





## Referencias

- [1] McCabe K, Turner J, Hernandez M, Merkel T. Regulation and function of the *Bordetella pertussis* aerosol tolerance genes. 9th International Bordetella Symposium 2010.
- [2] Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, Martinez de Tejada G. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* 2005;73(2):748-60.
- [3] Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 2009;27(43):6034-41. Epub 2009 Aug 8.
- [4] Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* 2012;7(2):e31985.
- [5] Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010 Jan;10(1):36-49.
- [6] Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* 2012 Aug 22.
- [7] Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 1999;17(19):2366-76.
- [8] van den Berg BM, David S, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R. Protection and humoral immune responses against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular or cellular pertussis immunogens. *Vaccine* 2000;19(9-10):1118-28.
- [9] Mills KH. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 2001;3(8):655-77.
- [10] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003;188(5):738-42. Epub 2003 Aug 5.
- [11] Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 2001;167(11):6545-51.
- [12] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [13] Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM, Jr., et al. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005 Apr;5(5):1331-45.

- [14] Nilsson CL, Larsson T, Gustafsson E, Karlsson KA, Davidsson P. Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative two-dimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry. *Anal Chem* 2000 May 1;72(9):2148-53.
- [15] Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, et al. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics* 2002 May;2(5):580-90.
- [16] Peng X, Ye X, Wang S. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine* 2004 Jul 29;22(21-22):2750-6.
- [17] Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 2010 Mar;78(3):907-13.
- [18] Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991 Feb;5(2):171-7.
- [19] Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KH. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology* 1996;87(3):372-80.
- [20] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16(20):1907-16.
- [21] Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16(20):1901-6.
- [22] Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1998;66(2):594-602.
- [23] Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KH. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun* 1993;61(8):3190-8.
- [24] Faquim-Mauro EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999 Oct 1;163(7):3572-6.
- [25] Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol* 2000 Dec;12(12):1733-40.
- [26] Chen X, Oppenheim JJ, Howard OM. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25-responder T cells than C57BL/6 mice. *J Leukoc Biol* 2005 Jul;78(1):114-21.
- [27] Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides

new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. J Bacteriol 2011 Jul 8.

[28] Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. J Immunol 2003 Jan 1;170(1):194-200.



# Capítulo 6

## Discusión General





## 6. Discusión General

La tos convulsa es una enfermedad inmunoprevenible del tracto respiratorio, altamente contagiosa, causada por el cocobacilo Gram negativo *B. pertussis*. A pesar de las altas tasas de vacunación, la enfermedad continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. En las últimas décadas se ha observado un cambio en la epidemiología de la enfermedad, con un marcado aumento en el número de casos informados en adolescentes y adultos [1], hoy referenciados como la principal fuente de transmisión de la enfermedad a infantes no vacunados o con esquemas de vacunación incompletos. Esta situación, que también ha sido observada en Argentina [2], ha determinado que en distintos países del mundo, incluido el nuestro, se incorporen al esquema de vacunación los adolescentes de 11 años, embarazadas, y personal de riesgo.

En la actualidad existen dos tipos de vacunas, las vacunas celulares, formuladas con células enteras de *B. pertussis* en fase virulenta inactivadas por calor, y las vacunas acelulares, formuladas con factores de virulencia purificados. De estas últimas existen en uso preparaciones tri y pentavalentes. Las vacunas celulares se usan en la población infantil en algunos países, como es el caso de Argentina, pero los adultos solo pueden ser vacunados con formulaciones acelulares debido a la gran reactogenicidad de las celulares. Existe consenso en que las vacunas en uso, en especial las acelulares, protegen contra los síntomas de la enfermedad pero no generan una protección eficiente contra la colonización. Esto, unido a la corta duración de la inmunidad inducida por vacunación, y sumado a que los esquemas de vacunación no contemplan dosis de refuerzos regulares para adultos, ha permitido la circulación permanente del patógeno en la población. Se cree que la vacuna celular confiere un nivel de protección mejor que la acelular contra la colonización y que la reemergencia declarada hace unos años podría estar relacionada con la introducción masiva de la vacuna acelular. La aparición de brotes epidémicos causados por cepas circulantes con variantes polimórficas en todos los antígenos incluidos en las vacunas acelulares [3-6], y la aparición de cepas circulantes que no expresan algunos de estos antígenos [7, 8], son consistentes con esta hipótesis y sugieren una inmunoselección dirigida por vacunación poniendo de manifiesto la necesidad de revisar las vacunas en uso.

En la actualidad existen distintos estudios orientados a mejorar las formulaciones vacunales, algunos basados en la búsqueda de nuevos inmunógenos y otros en el desarrollo de nuevas vacunas celulares y la búsqueda de rutas de inmunización alternativas. En lo que se refiere a nuevos inmunógenos el intento más importante se llevó a cabo hace unos años cuando se propuso al autotransportador BrkA [9]. Esta proteína se expresa sólo en fase virulenta y según se observó, aunque no confiere protección en formulación monovalente, es capaz de aumentar el nivel de protección conferido por la vacuna divalente (PT y FHA), actualmente en desuso, pero no mejora el nivel de protección conferido por la trivalente (PT, FHA, y Prn). Así, el empleo de BrkA solo serviría como reemplazo de Prn. Sin embargo el reemplazo de un antígeno tan importante por su capacidad de generar anticuerpos opsonofagocíticos requiere de estudios que justifiquen dicho cambio. Estos estudios nunca se llevaron a cabo, o al menos no se han publicado hasta el momento. El resto de los estudios apuntan al desarrollo de nuevas vacunas celulares. Actualmente se encuentra en marcha el desarrollo de vacunas formuladas con una cepa atenuada de *B. pertussis* que sería administrada por vía nasal. Esta vacuna se encuentran en etapa clínica de evaluación [10]. Si bien esta vía de administración evita los efectos sistémicos del LPS, por lo que podría permitir incluir a los adultos en los esquemas de vacunación, el hecho de que se trate de una cepa atenuada ha generado mucha controversia por la posibilidad de reversión y la imposibilidad de erradicación que conlleva. Paralelamente, se ha retomado un viejo proyecto que comenzó en la década del '90 en el RIVM de Holanda que impulsa la formulación de vacunas a partir de vesículas de membrana externa de *B. pertussis*. Esta estrategia se impulsó para el desarrollo de vacuna contra *Neisseria meningitidis B* en el mismo Instituto Holandés a fines de los '80. Este tipo de formulaciones son dificultosas y hasta el momento no se han logrado resultados concluyentes. De todas formas tanto para el caso de las vacunas celulares como para aquellas que se formulen con vesículas de membrana persiste el problema que se suscita con la vacuna acelular, qué tipos de antígenos debieran estar presentes en las formulaciones para mejorar la eficacia contra la colonización.

En el año 2007 [11], nuestro grupo comenzó a trabajar en ésta temática, tratando de identificar nuevos antígenos protectores, orientando la búsqueda de nuevos inmunógenos entre las proteínas cuya expresión se encuentra inducida por las condiciones de entorno que



la bacteria encuentra *in vivo*, de modo de asegurar su expresión en el fenotipo infectante. En particular se esperaba poder identificar proteínas inmunogénicas cuya expresión fuese inducida en condiciones fisiológicas, y que no estuviesen reguladas con los demás factores de virulencia cuya expresión se ve desfavorecida por las condiciones de entorno durante la transmisión. Así, comenzamos con el estudio del proteoma de *B. pertussis* cultivada en estrés nutricional por baja disponibilidad de hierro, ya que ésta es una de las condiciones de estrés más importantes que la bacteria enfrenta dentro de su hospedador en todo momento. Se esperaba que el estudio del proteoma ayudase a comprender mejor la patogénesis y posibilite la identificación de nuevos inmunógenos. Estos primeros estudios fueron realizados mediante proteómica 2-DE [11]. Con ésta metodología se identificaron nuevas proteínas inducidas y reprimidas en esta condición lo cual permitió la primera visión global de la adaptación a esta condición. Se observaron, entre otros, la inducción de mecanismos de supervivencia no descriptos en *B. pertussis* hasta el momento, y un grupo de proteínas inmunogénicas sobre-expresadas en limitación de hierro reconocidas por sueros de individuos infectados con *B. pertussis*. Los estudios realizados en este trabajo de Tesis son una continuación de esos estudios iniciales. En este trabajo se profundizó el estudio del proteoma de *B. pertussis* y de la respuesta general a la limitación de hierro; y, se investigó la potencialidad de las proteínas identificadas como inmunógenos expresados *in vivo* para mejorar la protección conferida por vacunación.

En los estudios de proteómica comparativa llevados a cabo mediante electroforesis bidimensional mencionados más arriba, se identificaron únicamente aquellas proteínas inducidas o reprimidas en limitación de hierro. El uso de proteómica *shotgun* (este trabajo de Tesis) nos permitió, el análisis global del proteoma de *B. pertussis* tanto en limitación como en exceso de hierro, y la identificación de un gran número de proteínas en ambos fenotipos, que permiten hacer interpretaciones metabólicas más completas, entre otras derivaciones. La gran sensibilidad de esta técnica, permitió a su vez la identificación de un gran número de proteínas diferenciales que en los estudios previos realizados por nuestro grupo no habían sido observadas. Es en este último grupo es que centramos nuestra atención en este trabajo de Tesis. Uno de los resultados más llamativos que arrojó este estudio fue que la adaptación de la bacteria a la limitación de hierro conduce a un estado de atenuación de la virulencia, con una disminución en el nivel de expresión de la mayoría de

los factores de virulencia conocidos, entre ellos la principal adhesina de *B. pertussis*, FHA. Contrariamente a lo que podría esperarse, la disminución de la virulencia podría ser favorable para la bacteria en el desarrollo de la infección según se detalla a continuación.

Por un lado, la disminución de FHA. Ha sido ampliamente demostrado que, en ausencia de anticuerpos opsonizantes, esta proteína media la interacción de la bacteria con macrófagos y neutrófilos del hospedador por unión a CR3 [12-14]. Los ensayos de fagocitosis descritos en el Capítulo 3 indican que la bacteria cultivada en limitación de hierro presenta una menor adhesión a neutrófilos humanos, consistente con el menor nivel de expresión de FHA observado en el proteoma. Es importante señalar que FHA también media la adhesión a células epiteliales [15, 16] y podría especularse que una menor expresión de esta adhesina lleve a menores niveles de adhesión bacteriana interfiriendo con la colonización inicial. Sin embargo, ensayos previos de nuestro grupo demuestran que bajo estas condiciones *B. pertussis* presenta una mayor adhesión a células epiteliales independiente de FHA [17], lo que sugiere que en ausencia de hierro la bacteria expresa una o más adhesinas distintas de FHA que le permitirían adherirse a al epitelio respiratorio.

Por otro lado observamos que la limitación de hierro induce la sobre-expresión de proteínas relacionadas con la formación de biofilm y con la formación de polisacárido capsular. El análisis macromolecular mediante espectroscopía FT-IR también mostró una clara diferencia en la zona del espectro correspondiente carbohidratos, indicando una sobreexpresión de estructuras que involucran carbohidratos en limitación de hierro. Si bien aún existen controversias en relación a la existencia de cápsula en *B. pertussis*, estudios recientes demuestran la presencia de una micro-cápsula, cuya expresión aumenta en la fase avirulenta de la bacteria [18]. La presencia de cápsula podría eventualmente interferir con la captura de la bacteria por las células fagocíticas del hospedador, evitar la acción del complemento, entre otras ventajas. De esta forma la condición de entorno que la bacteria encuentra durante la infección podría contribuir a la persistencia de la bacteria dentro del hospedador a través de la inducción de ciertos mecanismos de evasión como son la formación de biofilm y/o la disminución fagocitosis, como consecuencia de un menor nivel de expresión de FHA o la presencia de una cápsula.

En este mismo sentido, la disminución en el nivel de expresión de la proteína Fim observada en *B. pertussis* limitada en hierro podría contribuir a la evasión de las defensas de huéspedes inmunes o no inmunes. Por un lado, debido a que en ausencia de anticuerpos opsonizantes, Fim interacciona con VLA-5 en la superficie de monocitos provocando un aumento de expresión de CR3 [19], sitio de unión de FHA. Una menor expresión de Fim podría contribuir aún más a la evasión de la fagocitosis. Por otro lado, porque de los anticuerpos generados por vacunación, aquellos dirigidos contra Fim son los únicos capaces de inhibir eficientemente la adhesión a epitelio gracias a su capacidad aglutinante que a su vez favorece la eliminación de la bacteria [20].

También se observó un aumento en el nivel de expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo. Si bien en ausencia de anticuerpos opsonizantes la fagocitosis de *B. pertussis* conduce a la evasión del tráfico a lisosomas de una proporción de las bacterias fagocitadas [21, 22], otra proporción son transportadas a lisosomas, donde la mayor expresión de las proteínas relacionadas al estrés oxidativo podría conferirles ventajas para la sobrevivencia dentro de estos compartimentos.

Por último, la menor expresión de las principales toxinas de *B. pertussis* generaría una menor respuesta inflamatoria ante la entrada de la bacteria, lo que representaría una ventaja para la sobrevivencia de la bacteria, al menos en los estadios iniciales de la infección.

En lo que se refiere a los mecanismos de captura de hierro de alta afinidad, éste estudio reveló por primera vez el aumento de la expresión de varias proteínas involucradas en la adquisición de hierro mediada por el sideróforo de *B. pertussis* alcaligina y por el xenosideróforo enterobactina. Además, se confirmó la expresión de dos receptores de sideróforos, BrfI y BrfB, identificados por primera vez por nuestro grupo [11]. También se confirmó un aumento de la expresión del sistema de captura de hierro de grupos hemo y se identificaron nuevas proteínas pertenecientes a este sistema. Por último se confirmó la expresión de dos transportadores de hierro previamente identificados por proteómica 2-DE, denominados AfuA e IRP1-3 [11], inmunogénicos *in vivo* y de importancia durante la infección.

La menor expresión de la mayoría de los factores de virulencia observada en lo que podría ser el fenotipo infectante contribuye a disminuir el reconocimiento de la bacteria en individuos vacunados. Así, estos resultados podrían sumarse a las condiciones modulantes durante la transmisión, y la inmunoselección de cepas con variante polimórficas en antígenos vacunales para explicar de la poca eficiencia de las vacunas acelulares en evitar la colonización. En este contexto, la identificación de antígenos cuya expresión se encuentre inducida en el fenotipo infectante, podría contribuir a mejorar la protección conferida por estas vacunas.

En estudios previos de nuestro grupo [11] se identificaron mediante inmunoproteómica dos proteínas de *B. pertussis*, relacionadas con la captura de hierro, denominadas AfuA e IRP1-3, expresadas durante la infección y antigénicas *in vivo*. La inducción de la expresión de estas proteínas en limitación de hierro fue confirmada en este trabajo. AfuA es una proteína homóloga a proteínas de transporte de hierro presentes en otro patógenos [23-26], críticas durante la infección. La capacidad de esta proteína para unir hierro fue demostrada por Tom-Yew [27]. Recientemente, Brickman y colaboradores demostraron la importancia de AfuA en la utilización de los sideróforos alcaligina y enterobactina, cruciales en la obtención de hierro durante la infección [28]. Por otro lado, IRP1-3 presenta homología con una proteína de unión a hierro de *C. jejuni* [29]. El análisis bioinformático de IRP1-3 realizado en este trabajo indica que esta es una proteína de membrana con capacidad de unir hierro y que en presencia del metal forma un dímero. Recientemente, ha sido demostrado que la adquisición de hierro a pH próximos a 6 depende de un sistema de captura del metal que tiene a IRP1-3 como actor principal [30]. Así, AfuA e IRP1-3 podrían ser de vital importancia para la adquisición de hierro dentro del hospedador. Otra proteína identificada previamente por inmunoproteómica [11], cuyo estudio continuó en este trabajo, es Lip. Además de un posible candidato vacunal debido a su expresión y antigenicidad *in vivo*, el interés por ésta proteína deriva que por tratarse de una lipoproteína podría presentar propiedades adyuvantes que logran mejorar las vacunas actuales. La expresión de estas tres proteínas *in vivo*, como así también su inmunogenicidad se confirmó en este trabajo a través del empleo de un panel de sueros de individuos infectados con *B. pertussis*. Todos los sueros estudiados demostraron tener alto título de anticuerpos dirigidos contra cada una ellas. En este trabajo también demostramos que estas

tres proteínas se expresan independientemente del estado de virulencia de la bacteria, por lo que las condiciones modulantes que *B. pertussis* podría encontrar durante la transmisión no afectarían la expresión de estas proteínas. Otro resultado importante de estos estudios es que las tres proteínas se encuentran altamente conservadas en aislados clínicos de *B. pertussis*, tal vez como consecuencia de la falta de inmunoselección por vacunación, ya que ni las vacunas celulares ni las acelulares incluyen proteínas inducidas bajo estrés nutricional por limitación en hierro.

Estudios de protección activa en ratones mostraron que Lip no es capaz de conferir protección en formulaciones monovalentes. Sin embargo, la proteína es capaz de generar alto título de anticuerpos aún en ausencia de adyuvantes, señalando su potencial capacidad inmunoestimulante. Actualmente se están llevando a cabo estudios orientados a evaluar la capacidad de Lip para actuar como adyuvante en combinación con otros antígenos, y su desempeño en combinación con distintas formulaciones acelulares. Por el contrario, la inmunización con AfuA o con IRP1-3 confiere protección contra la infección con *B. pertussis* aún en formulaciones monovalente. Ambas proteínas son inductoras de anticuerpos con actividad opsonizante, crítica en la inmunidad contra *B. pertussis* mediada por anticuerpos, y cierto nivel de inmunidad celular, lo que podría explicar su capacidad protectora. En el caso de AfuA no puede descartarse que la protección este mediada además por anticuerpos que interfieren con la captura de hierro.

La incorporación de adultos en el esquema de vacunación en casos especiales, como en nuestro país, o de forma sistemática y regular, como se está proponiendo en otros países, requiere de mejores vacunas acelulares. La incorporación de antígenos de las características de AfuA e IRP1-3 podría representar una buena opción por todo lo que se ha mencionado acerca de su expresión en el fenotipo infectante independientemente del estado de virulencia de la bacteria y su conservación en cepas circulantes, entre otras consideraciones. Ambos antígenos probaron inducir protección por si solos, entonces se evaluó si eran capaces de aportar significativamente a la protección conferida por las vacunas en uso. El agregado de cada antígeno por separado condujo a un aumento significativo en la protección, el cual se vio aumentado cuando se agregaron ambos antígenos. Aunque hacen

falta estudios confirmatorios, este mayor nivel de protección parecería deberse fundamentalmente a la incorporación de estos dos nuevos blancos de opsoninas a la vacuna.

En conjunto, los resultados descritos en este trabajo de Tesis Doctoral indican que el fenotipo expresado por *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro es significativamente distinto del expresado por la bacteria cultivada en exceso de este nutriente. Bajo limitación de hierro no sólo se ve modificada la expresión de un gran número de proteínas implicadas en la captura del metal, sino que además la bacteria presenta un estado de virulencia atenuado, con una menor expresión de un gran número de los factores de virulencia conocidos y la inducción de proteínas potencialmente involucradas en mecanismos de inmunoevasión y persistencia. Estas características podrían conferirle ventajas durante la infección de huéspedes tanto inmunes como no inmunes. Debido a que *B. pertussis* se encuentra limitada en hierro durante la infección, es posible especular que el fenotipo infectante también lo esté. Las vacunas actuales se encuentran formuladas o bien con bacterias enteras en fase virulenta cultivadas en exceso de hierro, o bien con factores de virulencia purificados. Cualquiera sea el caso, la deficiencia en la protección contra la colonización podría explicarse al menos en parte, por la estructura antigénica del fenotipo infectante. En este contexto, los estudios presentados en esta Tesis señalan que la incorporación de AfuA e IRP1-3, en las formulaciones vacunales podrían contribuir a mejorar la inmunoprevención.

## Referencias

- [1] Sandora TJ, Gidengil CA, Lee GM. Pertussis vaccination for health care workers. Clin Microbiol Rev 2008 Jul;21(3):426-34.
- [2] Riva Posse C, P.Miceli.. Evolución de coqueluche en la Argentina del siglo XX. Medicina 2005(65):7-16.
- [3] Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun 1998;66(2):670-5.
- [4] Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J. Variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. Infect Immun 1999;67(6):3133-4.
- [5] Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, et al. Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. Microbiology 1999;145(Pt 8):2069-75.
- [6] Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T. Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. J Infect Dis 2000;182(5):1402-8. Epub 2000 Oct 9.
- [7] Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. Vaccine 2009;27(43):6034-41. Epub 2009 Aug 8.
- [8] Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient Bordetella pertussis in Japan. PLoS One 2012;7(2):e31985.
- [9] Marr N, Oliver DC, Laurent V, Poolman J, Denoel P, Fernandez RC. Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. Vaccine 2008;26(34):4306-11. Epub 2008 Jun 26.
- [10] Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Quatannens J, Engle J, Goldman WE, et al. Attenuated Bordetella pertussis: new live vaccines for intranasal immunisation. Vaccine 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-54-5.
- [11] Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the Bordetella pertussis proteome during iron starvation. J Proteome Res 2007;6(7):2518-28. Epub 007 May 25.
- [12] Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. Cell 1990 Jun 29;61(7):1375-82.

- [13] Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 1994 Oct 1;180(4):1225-33.
- [14] Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Integrin-mediated localization of Bordetella pertussis within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* 1991 May 1;173(5):1143-9.
- [15] Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. *Infect Immun* 1993 Jul;61(7):2780-5.
- [16] Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by Bordetella pertussis: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog* 2001 May;30(5):279-88.
- [17] Vidakovics ML, Lamberti Y, Serra D, Berbers GA, van der Pol WL, Rodriguez ME. Iron stress increases Bordetella pertussis mucin-binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51(2):414-21. Epub 2007 Aug 29.
- [18] Neo Y, Li R, Howe J, Hoo R, Pant A, Ho S, et al. Evidence for an intact polysaccharide capsule in Bordetella pertussis. *Microbes Infect* 2010 Mar;12(3):238-45.
- [19] Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R. Binding of FimD on Bordetella pertussis to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1995 Oct 15;155(8):3972-8.
- [20] Rodriguez ME, Hellwig SM, Perez Vidakovics ML, Berbers GA, van de Winkel JG. Bordetella pertussis attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46(1):39-47.
- [21] Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in Bordetella pertussis phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* 2008;44(6):501-11. Epub 2008 Jan 9.
- [22] Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun* 2010 Mar;78(3):907-13.
- [23] Khan AG, Shouldice SR, Kirby SD, Yu RH, Tari LW, Schryvers AB. High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from Haemophilus influenzae is required for acquiring iron from transferrin. *Biochem J* 2007;404(2):217-25.
- [24] Chen CY, Berish SA, Morse SA, Mietzner TA. The ferric iron-binding protein of pathogenic Neisseria spp. functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol Microbiol* 1993;10(2):311-8.
- [25] Tom-Yew SA, Cui DT, Bekker EG, Murphy ME. Anion-independent iron coordination by the Campylobacter jejuni ferric binding protein. *J Biol Chem* 2005;280(10):9283-90. Epub 2004 Dec 21.



- [26] Angerer A, Gaisser S, Braun V. Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J Bacteriol* 1990 Feb;172(2):572-8.
- [27] Tom-Yew SA. Characterization of two new classes of periplasmic ferric binding proteins. Thesis Doctoral 2008.
- [28] Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol* 2011 Jul 8.
- [29] Chan AC, Doukov TI, Scofield M, Tom-Yew SA, Ramin AB, Mackichan JK, et al. Structure and function of P19, a high-affinity iron transporter of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J*;401(4):590-604. Epub 2010 Jun 30.
- [30] Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol* 2012 Aug 24.